

UNIVERSITÉ BORDEAUX SEGALEN

Année 2013

Thèse n° 2085

Thèse pour le

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ BORDEAUX SEGALEN

Mention : Sciences, Technologies, Santé

Option : Biologie Cellulaire et Physiopathologie

Présentée et soutenue publiquement le 6 décembre 2013

par

Benoît ALLARD

né le 12 août 1986 à Redon

**Implication du PAR-2 dans le remodelage musculaire lisse
bronchique de la physiopathologie de l'asthme**

Membres du jury

Michel AUBIER

PU-PH, Université Denis Diderot - Paris VII

Président

Antoine MAGNAN

PU-PH, Université de Nantes

Rapporteur

Anne TSICOPOULOS

DR INSERM, Université de Lille

Rapporteur

Cécile CONTIN-BORDES

MCU-PH, Université de Bordeaux

Examinatrice

Patrick BERGER

PU-PH, Université de Bordeaux

Directeur de thèse

À Bérange

« Nenhum de nos e tao bom quanto todos nos juntos »

Mestre Zé Mario

« Aucun de nous n'est aussi bon que nous tous réunis »

Zé Mario, maître de capoeira

AVANT-PROPOS

Le travail expérimental présenté dans cette thèse a été réalisé dans le Centre de Recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux de l'Université Bordeaux Segalen (INSERM, U1045).

Je tiens à remercier très chaleureusement Monsieur le Professeur Patrick BERGER pour m'avoir fait confiance au cours de ces trois ans de thèse. Merci de m'avoir donné l'opportunité de travailler sur les problématiques de l'asthme. Je n'oublierai pas les nombreux « brain storming » ainsi que les nombreux conseils qui m'ont aidé et guidé tout au long de ma formation. Merci également pour votre aide dans la recherche du post-doctorat. Grâce à vous, je vais pouvoir apprendre à parler le caribou. J'espère y être à la hauteur et ne pas décevoir vos attentes. Enfin, merci pour votre soutien, votre optimisme et votre disponibilité. Soyez assuré de ma profonde reconnaissance.

Je remercie très sincèrement Monsieur le Professeur Roger MARTHAN pour son accueil dans son laboratoire. Je tiens à vous exprimer mon admiration pour vos nombreuses qualités humaines et scientifiques. Merci également pour votre soutien, vos conseils avisés et votre sens de l'humour. Soyez assuré de ma reconnaissance et de mon profond respect.

Je remercie très sincèrement Monsieur le Professeur Michel AUBIER de m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence du jury de cette thèse.

Je remercie très sincèrement Madame le Docteur Anne TSICOPOULOS et Monsieur le Professeur Antoine MAGNAN pour l'honneur qu'ils me font de participer à ce jury et pour le temps qu'ils ont bien voulu me consacrer en étant rapporteurs de mon travail.

Je remercie très chaleureusement Madame le Docteur Cécile CONTIN-BORDES d'avoir également accepté de participer à ce jury de thèse.

Je tiens également à remercier :

- Tous les membres du Centre de Recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux pour leur accueil, leur aide et leur bonne humeur. Je tiens à remercier plus particulièrement les membres de l'équipe bronche : Annaïg OZIER, Imane BARA, Olga OUSOVA, Thomas TRIAN, Pierre-Olivier GIRODET, Gabrielle CARVALHO, Jennifer CATTIAUX, Elise MAURAT et Isabelle DUPIN. Un grand merci au secrétariat : Armelle DESVEAUX, Sophie, et Lebna MIZANI. Merci aussi à Claude VINCENDEAU pour son humour, sa gentillesse et sa grande sagesse. Une pensée pour les anciens, présents et futurs lofteurs, petites mains pensantes du laboratoire (Didi, Naf, GG, Thibaud, et les nombreux masters).

- Tout le personnel des EFR du CIC de Haut-Lévêque ainsi que Mathieu THUMEREL et Hugues BEGUERET, sans oublier les patients !

- Tous les membres du CIRID (UMR5164) que j'ai eu le plaisir de rencontrer au cours de mon master 2. Un grand merci à Monsieur le Professeur Jean-François MOREAU, pour son accueil, sa bienveillance, ses histoires et son immense savoir. Merci à Julie DECHANET-MERVILLE et Myriam CAPONE pour m'avoir fait découvrir le monde des lymphocytes $T\gamma\delta$ et pour leur gentillesse. Merci à Vincent PITARD et Siantago GONZALES, les maîtres de la cytométrie, toujours disponibles. Et bien sûr, un grand merci à mes compagnons de galères

Clément, Quentin et Loïc, qui m'ont permis de me dépasser, et de donner un sens au sauvetage des ballons...

- Tous les capoeiristes du groupe Arte Negra, qui m'ont accompagné au cours de ces 8 ans d'études. Un grand merci à Monsieur le Professeur Cacique. Tes entraînements militaires ont été une soupape au cours de ces années. J'espère avoir le temps et l'honneur de transmettre ton enseignement à Montréal.

- A Philou, Wilou, Déli, Bizot,... votre amitié est sans faille.

- A ma famille, sans qui rien n'aurait été possible. Merci pour votre compréhension et votre soutien.

- A Bérangère, parce que derrière chaque homme, il y a une femme sur qui on peut compter.

Sommaire

AVANT-PROPOS	4
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX	9
LISTE DES ABRÉVIATIONS	12
LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS.....	21
MODULES COMPLEMENTAIRES	23
INTRODUCTION.....	24
CHAPITRE I : Généralités.....	26
I – A – Physiopathologie de l’asthme	27
I – A – 1 – Description	27
I – A – 1 – a. Définition	27
I – A – 1 – b. Diagnostic, traitements et classification	31
I – A – 1 – c. L’asthme sévère	39
I – A – 2 – Les caractéristiques de l’asthme	44
I – A – 2 – a. Hyperréactivité bronchique.....	45
I – A – 2 – b. Inflammation bronchique.....	48
I – A – 2 – c. Remodelage bronchique.....	62
I – B – Le rôle pivot de la CML dans la physiopathologie de l’asthme	67
I – C – Les récepteurs activés par les protéases (PARs) des voies aériennes.....	88
I – C – 1 – Généralités	88
I – C – 1 – a. Activation et localisation des PARs au niveau des voies aériennes.....	90
I – C – 1 – b. Signalisation des PARs	99
I – C – 2 – Physiologie du PAR-2 des voies aériennes et implication dans l’asthme	102
CHAPITRE II : Matériel et Méthodes	106
II – A – Culture des cellules musculaires lisses bronchiques humaines (CML)	107
II – A – 1. Obtention des CML	107
II – A – 2. Immunophénotypage des CML	109
II – A – 3. Congélation des CML	114
II – B – Culture des cellules épithéliales bronchiques humaines	114
II – B – 1. Lignée	114
II – B – 2. Culture primaire.....	115
II – C – Production et titration du rhinovirus	116
II – D – Expression protéique et transcriptionnelle	118

II – D – 1. Cytométrie en flux.....	118
II – D – 2. Western blot	119
II – D – 3. ELISA.....	122
II – D – 4. Immunocytochimie.....	122
II – D – 5. Immunohistochimie.....	123
II – D – 6. RT-PCR quantitative en temps réel.....	124
II – E – Prolifération cellulaire	128
II – F – Migration des Neutrophiles	129
II – F – 1. Isolation des neutrophiles.....	129
II – F – 2. Migration des neutrophiles.....	131
II – G – Lentivirus	132
II – G – 1. Structure des lentivirus	132
II – G – 2. Production des particules lentivirales	136
II – G – 3. Titration des particules lentivirales	138
II – G – 4. Transduction lentivirale des CML.....	138
II – G – 5. Vérification de l'efficacité de la transduction lentivirale	138
II – H – Analyse statistique	139
CHAPITRE III : Résultats et Discussion	140
I – A – Étude de l'expression et de la fonction du PAR-2 dans les cellules musculaires lisses bronchiques d'asthmatiques.....	141
I – B – Étude de la stimulation de l'épithélium par les acariens de poussières de maison sur la prolifération des cellules musculaires lisses bronchiques d'asthmatiques	194
I – C – Étude des interactions neutrophiles-cellules musculaires lisses bronchiques	218
I – C – 1 – Localisation des neutrophiles dans les bronches d'asthmatiques sévères.....	218
I – C – 2 – Migration des neutrophiles	225
I – C – 3 – Effets des médiateurs neutrophiliques sur les CML	228
CHAPITRE IV : Conclusions et Perspectives	232
Références bibliographiques	236

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1 : Prévalence et mortalité de l’asthme.	28
Figure 2 : Taux standardisés de mortalité par asthme, tous âges, France métropolitaine, 1990-1999 et 2000-2010.	29
Figure 3 : Critères de sévérité de l'hyperréactivité bronchique.	33
Figure 4 : Approche thérapeutique de l’asthme basée sur le contrôle de la maladie.	38
Figure 5 : Groupement théorique des phénotypes d’asthmes émergeants basé sur la distinction entre asthme Th2-high et asthme non-Th2.	43
Figure 6 : Schéma de bronche d’un sujet sain, d’asthmatique et d’asthmatique durant une crise d’asthme.	44
Figure 7 : Principales sous-populations lymphocytaires T et leurs cytokines impliquées dans la physiopathologie de l’asthme.	49
Figure 8 : Cascade de recrutement des neutrophiles.	59
Figure 9 : Principales caractéristiques du remodelage musculaire lisse dans l’asthme.	66
Figure 10 : Schématisation de la structure et de l’activation d’un récepteur PAR.	89
Figure 11 : Signalisation cellulaire du PAR impliquant les protéines G.	100
Figure 12 : Désensibilisation, régulation et trafic vésiculaire des PARs.	101
Figure 13 : Rôle du PAR-2 dans la physiologie des voies aériennes.	105
Figure 14 : Phénotypage des CML par immunocytochimie.	111
Figure 15 : Phénotypage des CML par cytométrie en flux.	113
Figure 16 : Titration du rhinovirus.	117

Figure 17 : Constructions plasmidiques des deux vecteurs utilisés pour la production des particules lentivirales.	134
Figure 18 : Construction plasmidique du troisième vecteur.	135
Figure 19 : Production de particules lentivirales dans les cellules 293T.	137
Figure 20 : Immunohistochimie de l'élastase du neutrophile	219
Figure 21 : Corrélation entre le nombre de neutrophiles dans la bronche et le muscle	220
Figure 22 : Nombre de neutrophiles dans la bronche et dans le muscle	222
Figure 23 : Corrélations et distance minimale ou moyenne entre les neutrophiles et le muscle lisse bronchique.....	223
Figure 24 : Taille du muscle en fonction de la présence de neutrophiles dans le muscle.....	224
Figure 25 : Chimiotactisme des neutrophiles	226
Figure 26 : Chimiotactisme des neutrophiles et anticorps bloquant l'IL-8.....	227
Figure 27 : Les neutrophiles induisent la prolifération des CML	228
Figure 28 : Augmentation du niveau de chitotriosidase dans le sérum des asthmatiques sévères	229

Tableau 1 : Classification de l'asthme en fonction des paramètres cliniques et fonctionnels ventilatoires.	36
Tableau 2 : Classification de l'asthme en fonction de la charge thérapeutique et des symptômes.....	36
Tableau 3 : Classification de l'asthme en fonction du contrôle de la maladie.....	37
Tableau 4 : Liste des principaux stimuli utilisés pour rechercher une hyperréactivité bronchique non spécifique.	46
Tableau 5 : Principales chimiokines et leurs récepteurs.	50
Tableau 6 : Protéases exogènes activatrices / inactivatrices des PARs.....	90
Tableau 7 : Protéases endogènes et peptides activateurs / inactivateurs des PARs	91
Tableau 8 : Effets <i>in vivo</i> des PARs dans les voies aériennes.....	94
Tableau 9 : Effets <i>in vitro</i> des PARs dans les voies aériennes en organes isolés	95
Tableau 10 : Effets <i>in vitro</i> des PARs épithéliaux dans les voies aériennes	96
Tableau 11 : Effets <i>in vitro</i> des PARs musculaires lisses dans les voies aériennes	97
Tableau 12 : Effets <i>in vitro</i> des PARs de fibroblastes dans les voies aériennes	98
Tableau 13 : Récapitulatif des anticorps utilisés en Western blot.....	121
Tableau 14 : Caractéristiques des amorces utilisées en RT-PCR quantitative.....	126
Tableau 15 : Caractéristiques cliniques des asthmatiques sévères.....	221

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AA : Acide aminé

ACQ : Asthma control questionnaire

ADNc : ADN complémentaire

ADNmt : ADN mitochondrial

AEBSF : 4-2-amino-éthyl-benzenesulfonyl fluoride hydrochloride

AIF : Apoptosis inducing factor

ALDH4 : Aldehyde dehydrogenase-4

AMCase : Acidic mammalian chitinase

AMPK : Adénosine monophosphate kinase

AMV : Avian myeloblastosis virus

AP1 : Activator protein 1

Apaf-1 : Apoptotic protease-activating factor-1

APC : Antigen-presenting cell

AS : Anti-sens

ATP/AMP : Adénosine (tri/mono) phosphate

Bad : Bcl-2-antagonist of cell death

Bak : Bcl-2 homologous antagonist killer

Bax : Bcl-2-associated X protein

Bcl-2 : B cell lymphoma-2

Bcl-xL : Bcl-2-like 1

BDP : Béclométhasone

BH3 : Bcl-2 homology domain 3

Bid : BH3 interacting domain death agonist

BPCO : Broncho-pneumopathie chronique obstructive

BR : Basic region

BRP-39 : Breast regression protein 39

BSA : Bovine serum albumin

CaCl₂ : Dichlorure de calcium

CAK : Cdk-activating kinase

CamKIV : Calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV

CawNO : Concentration en NO de la paroi bronchique

CBP/p300 : CREB-binding protein/p300

CDK : Cyclin-dependent kinase

C/EBP α : CCAAT enhancer-binding protein α

CGRP : Calcitonin gene related peptide

CHI3L1 : Chitinase 3 like-1

ChIP : Immunoprécipitation de la chromatine

CML : Cellule musculaire lisse

COI : Sous-unité I de la cytochrome c oxidase

Cox-2 : Cyclooxygénase-2

cPPT : Centre polypurine track

CPT : Capacité pulmonaire totale

CREB : cAMP response element-binding

CVF : Capacité vitale forcée

Cyt b : Cytochrome b

DAB : Diaminobenzidine tetrahydrochloride

DAPI : 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride

DawNO : Diffusion du NO

DBD : DNA binding domain

DEMM₂₅₋₇₅ : Débit expiratoire maximal médian entre 25 et 75% de la CVF

Der f : Dermatophagoides farinae

Der p : Dermatophagoides pteronyssinus

DMEM : Dulbecco's modified eagles medium

DMSO : Dimethyl sulfoxide

dNTP : Désoxyribonucléotide

DR4 : Death receptor 4

ECP : Eosinophil cationic protein

EDTA : Acide éthylène-diamine-tétra-acétique

EF-1 α : Elongation factor-1 α

EGFR : Epidermal growth factor receptor

ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay

ENA-78 : Epithelial-derived neutrophil-activating protein-78

EndoG : Endonucléase G

Env : Enveloppe

eNOS : NOS endothéliale

F_ANO : Fraction alvéolaire de NO

Fas-R : Fas-receptor

F_ENO : Fraction exhalée de NO

FITC : Fluorescein isothiocyanate

FIV : Feline immunodeficiency virus

FKN : Fraktalkine

FoxP3 : Forkhead box P3

FPRL-1 : Formyl peptide receptor-like 1

FSC : Forward scatter

GADD45 : Growth arrest and DNA-damage inducible 45

GFP : Green fluorescent protein

GH18 : Famille 18 des glycosides hydrolases

GM-CSF : Granulocyte macrophage colony stimulating factor

GRO- α : Growth regulated oncogene- α

G6P : Glucose-6-phosphate

HBSS : Hank's balanced salt solution

HC gp-39 : Human cartilage glycoprotein-39

Hdm2 : Human homolog of mouse double minute 2

HES : Hématoxyline-Éosine-Safran

HIV : Human immunodeficiency virus

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

HPRT-1 : Hypoxanthine phospho-ribosyl-transferase 1

HRB : Hyperréactivité bronchique

HRP : Horseradish peroxydase

HtrA2 : High-temperature requirement protein A2

IAP : Inhibitor of apoptosis protein

ICAM-1 : Inter-cellular adhesion molecule-1

ICS : Corticothérapie inhalée

IFN- γ : Interferon- γ

IKK : I κ B kinase

IMC : Indice de masse corporelle

iNOS : NOS inducible

IP-10 : Interferon- γ inducible protein-10

I-TAC : Interferon-inducible T-cell α -chemoattractant

J'awNO : NO bronchique

LABA : β -2 agoniste de longue durée d'action

LBA : Lavage broncho-alvéolaire

LTR : Long terminal repeat

LXA₄ : Lipoxine A₄

MAC : Molécule d'adhérence cellulaire

MAPK : Mitogen activated protein kinase

MBP : Major basic protein

MCP-1 : Monocyte chemotactic protein-1

MC_T : Mastocyte de type T

MC_{TC} : Mastocyte de type TC

Mdm2 : Mouse double minute 2

MEC : Matrice extra-cellulaire

MEK : MAPK Erk kinase

MIP-1 β : Macrophage inflammatory protein-1

MMP9 : Métalloprotéinase 9

MnSOD : Manganese superoxyde dismutase

MPF : Maturation promoting factor

MRA : Mycoplasma removal agent

mtTFA : Mitochondrial transcription factor A

NANC : Non adrénergique non cholinergique

nDNA : ADN nucléaire

NDP : Nucléoside diphosphate

NE : Neutrophil elastase

NES : Nuclear export signal

NF-kB : Nuclear factor-kappa B

NK-T : Natural killer T cell

NLS : Nuclear localization signal

NO : Monoxyde d'azote

NO₂ : dioxyde d'azote

NOS : NO synthase

nNOS : NOS neuronale

NOXA : Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1

NRF : Nuclear respiratory factor

OD : Oligomerization domain

OCS : Corticothérapie orale

OVA : Ovalbumine

O₃ : Ozone

PA : Paquet-année

PAR-2 : Protease activated receptor-2

PCR : Polymerase chain reaction

PBS : Phosphate buffered saline

P/CAF : p300/CPB-associated factor

PC20 : Provocative concentration

PDGF : Platelet derived growth factor

PE : Phycoérythrine

Penh : Enhanced pause

PET : Polyéthylène téréphtalate

PFA : Paraformaldéhyde

PGC1- α : Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1- α

PGM : Phosphoglycerate mutase

PI : Propidium iodide

PIG3 : p53-inducible gene 3

PKA : Protéine kinase A

PKR : Protéine kinase R

PO : Human acidic ribosomal phosphoproteins

Pol : polymérase

Ppb : Part par billion

PrD : Prolin domain

PUMA : p53 up-regulated modulator of apoptosis

PVDF : Polyvinylidene fluoride

p53INP1 : p53-induced nuclear protein 1

RANTES : Regulated on activation, normal T-cells expressed and secreted

Rb : Retinoblastoma protein

RCPG : Récepteur couplé aux protéines G

RD : Regulatory domain

RISC : RNA induced silencing complex

ROS : Espèces réactives dérivées de l'oxygène

RT : Reverse transcription

SCF : Stem cell factor

SCO2 : Synthesis cytochrome c oxydase 2

SDS : Sodium dodécyl sulphate

S : Sens

SEM : Écart standard à la moyenne

shRNA : Small hairpin RNA

siRNA : Small interfering RNA

SH3 : Src homology 3-like

SIN : Self inactivated

SMAC : Second mitochondria-derived activator of caspase

SNP : Single-nucleotide polymorphism

SVF : Sérum de veau fœtal

TAD : Transactivation domain

TAF : TBP-associated factor

TBP : TATA box binding protein

TD : Tetramerization domain

TDM : Tomodensitométrie

TEM : Transition épithélio-mésenchymateuse

TEMED : N, N, N',N'-tétraméthylènediamine

TetO : Tet-opérateur

TGF- β : Transforming growth factor- β

TIGAR : *TP53*-induced glycolysis and apoptosis regulator

TIM : Triose phosphate isomérase

TIMP : Tissue inhibitor of metalloproteinase

TMB : Tetramethylbenzidine

TNF- α : Tumor necrosis factor- α

TNF-R : Tumor necrosis factor-receptor

TP : Tumor protein

TSLC-1 : Tumor suppressor in lung cancer-1

Treg : Regulatory T cell

TUNEL : Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick and labeling

Tween : Polyoxyéthylènesorbitan monolaurate

UH : Unités Hounsfield

UTR : Untranslated region

VA : Voies aériennes

V': Débit expiratoire

VCAM-1 : Vascular cell adhesion molecule-1

VEGF : Vascular endothelial growth factor

VEMS : Volume expiratoire maximum en une seconde

VIP : Vasoactive intestinal peptide

V'NO : Débit de NO

VR : Volume résiduel

VSV-G : Vesicular Stomatitis Virus - Glycoprotein

WPRE : Woodchuck post-transcriptional regulatory element

XIAP : X-linked inhibitor of apoptosis protein

YWHAZ : Tyrosine-3-mono-oxygenase/tryptophane 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide

LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

❖ **Revue didactique**

➤ **The pivotal role of airway smooth muscle in asthma pathophysiology.**

Ozier A, Allard B, Bara I, Girodet PO, Trian T, Marthan R, Berger P.

J Allergy (Cairo). 2011;2011:742710. Epub 2011 Dec 11

❖ **Articles originaux**

➤ **Proteinase activated receptor-2 expression and function in human asthmatic bronchial smooth muscle**

Benoit Allard *, Imane Bara *, Guillaume Gilbert, Gabrielle Carvalho, Thomas Trian, Annaig Ozier, Jennifer Gillibert-Duplantier, Olga Ousova, Elise Maurat, Jean-François Quignard, Pierre-Olivier Girodet, Roger Marthan , and Patrick Berger

(* participation équivalente)

(En révision favorable à Plos One, 2013)

➤ **House dust mites induce asthmatic smooth muscle cell proliferation through epithelium- and leukotrienes-dependent pathways**

Thomas Trian *, Benoit Allard *, Gabrielle Carvalho, Isabelle Dupin, Olga Ousova, Elise Maurat, Matthieu Thumerel, Pierre-Olivier Girodet, Roger Marthan, and Patrick Berger (* participation équivalente)

(En préparation)

❖ Communications

Internationales

- **Bronchial smooth muscle cell apoptosis: is it the good target?**

Comprehensive Pneumology Center – INSERM Winter Retreat, Fév 2012, Munich.

(Communication orale)

Nationales

- **Permis de tuer le muscle lisse bronchique dans l'asthme.**

Lung Storming, Mai 2011, Paris. (Communication orale)

- **Étude des interactions muscle lisse bronchique et neutrophile dans l'asthme.**

Lung Storming, Juin 2013, Paris. (Communication orale)

Locales

- **Étude de l'apoptose des cellules musculaires lisses bronchiques dans l'asthme.**

Journée de l'Axe Cardio-Thoracique, Nov 2011, Bordeaux. (Communication orale)

- **Effets de la stimulation chronique du PAR-2 (Protease Activated Receptor 2) des cellules musculaires lisses bronchiques du patient asthmatique.**

12ème Journée Scientifique de l'Ecole Doctorale Sciences de la Vie et de la Santé,

Mars 2012, Arcachon. (Poster)

Journée de la SFR Transbiomed, Juin 2012, Bordeaux. (Poster)

- **Étude des interactions muscle lisse bronchique et neutrophile dans l'asthme.**

13ème Journée Scientifique de l'Ecole Doctorale Sciences de la Vie et de la Santé,

Avril 2013, Arcachon. (Communication orale)

MODULES COMPLEMENTAIRES

Au cours de la thèse, j'ai eu la possibilité de suivre les formations complémentaires suivantes :

➤ **Valorisation de la recherche.**

Organisateur/Intervenants : Aquitaine Valo, Jean-Luc Chagnaud, Jacky Chartier, Isabelle Rey, Elodie Duru, Justine Lebail, 2012.

➤ **Optimiser sa recherche d'informations dans le domaine biomédical et mettre en place un système de veille scientifique efficace.**

Organisateur/Intervenants : URFIST de Bordeaux, Marie-France Andral, Patricia Volland-Nail, 2012.

➤ **Formation à l'enseignement par l'enseignement.**

Organisateur/Intervenants : Université de Bordeaux, André Quinton et Véronique Conrad-Lapostolle, 2013.

INTRODUCTION

L'asthme est une maladie inflammatoire chronique des voies aériennes, dont la fréquence ne cesse d'augmenter. En plus de l'inflammation, la maladie se caractérise par une hyperréactivité et un remodelage bronchique. Ces trois composantes de la pathologie relèvent de mécanismes complexes et seront détaillées dans le premier chapitre. Parmi les modifications structurales observées dans le remodelage, l'augmentation de la masse musculaire lisse bronchique est une composante majeure. En effet, elle est associée à un déclin de la fonction respiratoire [1].

Ce travail de thèse vient s'ajouter aux nombreuses études sur la compréhension des mécanismes physiopathologiques du remodelage musculaire lisse bronchique du patient asthmatique. Pour mieux comprendre ces mécanismes, nous avons fait le choix de nous focaliser sur le fonctionnement propre et l'environnement du muscle lisse bronchique, qui a un rôle central dans la pathologie. Le muscle lisse est en relation étroite avec les cellules inflammatoires mais aussi avec d'autres cellules de structure comme l'épithélium bronchique, sujet à de nombreuses altérations dans l'asthme. Les relations entre l'épithélium et le muscle lisse sont très peu connues. Les liens entre d'une part, l'inflammation bronchique notamment mastocytaire, éosinophile et lymphocytaire et, d'autre part, le remodelage bronchique ont été largement étudiés. Cependant, les interactions entre l'inflammation à dominante neutrophile et le remodelage bronchique, nécessitent de plus amples études. De plus, l'inflammation neutrophile est moins sensible aux traitements anti-inflammatoires, et soulève des enjeux thérapeutiques pour certains asthmatiques sévères.

Dans la partie expérimentale, nous avons choisi d'étudier plus particulièrement l'implication du récepteur PAR-2 (Protease Activated Receptor-2) dans le remodelage

musculaire lisse. En effet, son expression est retrouvée à la fois sur les cellules épithéliales et musculaires lisses bronchiques. Il est de plus, la cible de nombreux facteurs endogènes comme la tryptase mastocytaire pour le muscle, mais aussi exogènes comme les acariens de poussière de maison, pour l'épithélium. L'étude des stimulations du PAR-2 nous permettra d'apporter de nouvelles informations sur le développement du remodelage musculaire lisse bronchique.

La rédaction de cette thèse se compose de quatre grandes parties :

- **Chapitre I : Généralités.** Cette partie permet de faire un état des lieux sur l'asthme. Le rôle pivot de la cellule musculaire lisse dans la physiopathologie de l'asthme sera décrit à travers la publication d'une revue didactique. Finalement, la physiologie des PARs dans les voies aériennes sera détaillée.
- **Chapitre II : Matériels et Méthodes.** Les méthodes utilisées ou mises au point durant ces travaux de thèse seront présentées.
- **Chapitre III : Résultats et Discussion.** Le travail sur l'étude de l'expression et de la fonction du PAR-2 dans les cellules musculaires lisses d'asthmatiques sera présenté sous forme d'un article en révision à Plos One. Puis les effets de la stimulation épithéliale du PAR-2 par les acariens de poussière de maison sur la cellule musculaire lisse seront décrits dans un article en préparation. Finalement, des résultats préliminaires sur l'interaction entre le neutrophile et le muscle lisse bronchique seront présentés sous forme de résultats expérimentaux et discutés.
- **Chapitre IV : Conclusion et Perspectives.** L'ensemble des éléments précédents nous permettra de conclure ce travail de thèse et d'envisager des perspectives à court et moyen terme.

CHAPITRE I :

Généralités

I – A – Physiopathologie de l’asthme

Cette première partie permet au lecteur scientifique d’aborder la physiopathologie de l’asthme sans avoir de connaissances médicales approfondies. Elle permet de comprendre quels sont les enjeux cliniques et thérapeutiques.

I – A – 1 – Description

I – A – 1 – a. Définition

L’asthme est une maladie chronique des voies aériennes caractérisée par des crises récurrentes de difficultés respiratoires dyspnées avec respiration sifflante [2]. Lors d’une crise d’asthme, la paroi des bronches se contracte et s’épaissit, ce qui entraîne un rétrécissement de leur calibre interne et réduit le débit de l’air, notamment à l’expiration.

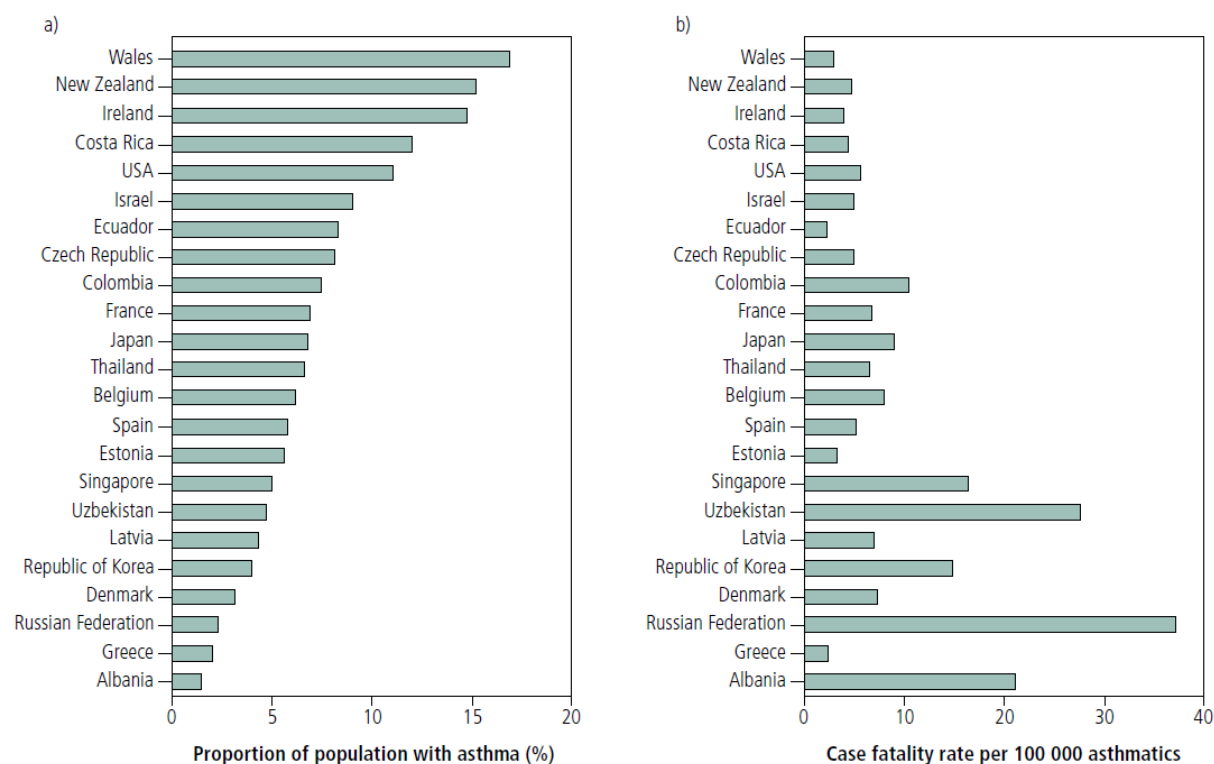
Les mécanismes physiopathologiques responsables de la maladie sont complexes et restent encore controversés à l’heure actuelle. On distingue 3 caractéristiques princeps, qui seront décrites ultérieurement : une hyperréactivité bronchique (HRB), une inflammation et un remodelage des voies aériennes.

Actuellement, les médicaments disponibles permettent d’atténuer les symptômes mais l’absence de traitement curatif d’une part, et l’impossibilité dans certains cas, de contrôler la maladie d’autre part, implique de mieux comprendre les mécanismes de ces 3 composantes mais aussi de comprendre comment elles interagissent entre elles.

Epidémiologie

D'après les estimations de l'OMS, il y a actuellement 300 millions d'asthmatiques dans le monde dont 30 millions en Europe et on estime à 400 millions le nombre d'asthmatiques en 2025 [3]. La prévalence de l'asthme a considérablement augmenté au cours des 20 dernières années, plus particulièrement chez les enfants, mais elle stagne à présent. L'asthme est d'ailleurs la maladie chronique la plus fréquente chez l'enfant et c'est la première cause d'absentéisme scolaire.

Figure 1 : Prévalence et mortalité de l'asthme.



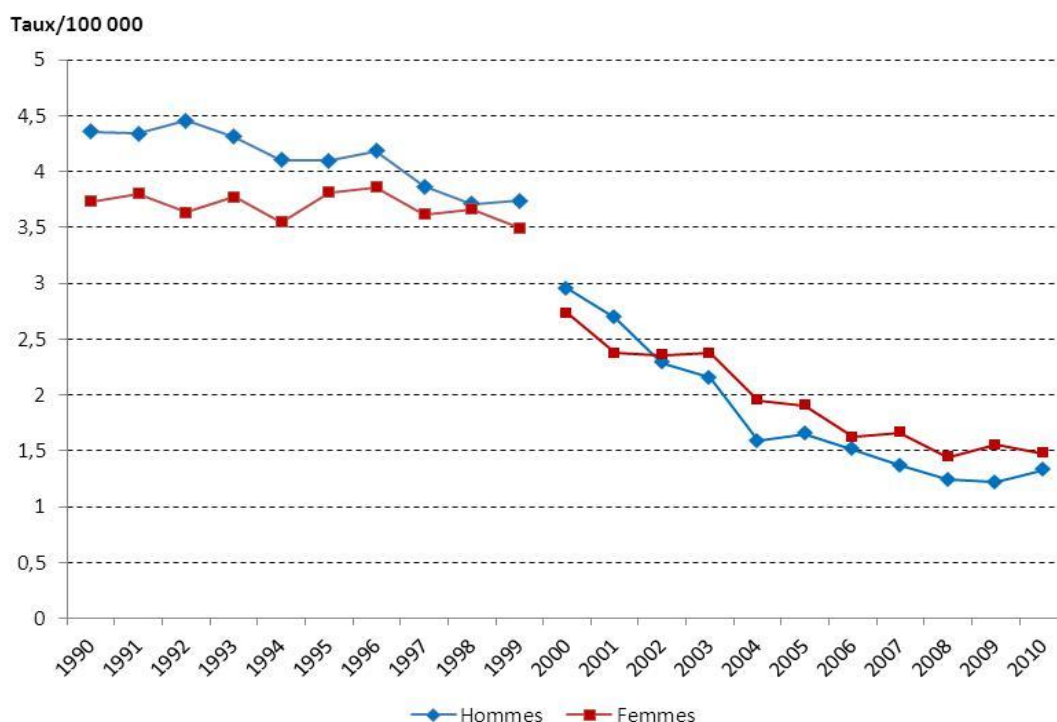
(D'après Bousquet et al. *The public health implications of asthma*, Bull World Health Organ, 2005)

Chaque année, 250 000 personnes décèdent de leur asthme à travers le monde [2]. La mortalité observée n'est pas corrélée avec la prévalence de l'asthme (Figure 1). Les données sont encore insuffisantes pour connaître les causes de cette variation de mortalité entre les différentes populations, mais il semble que l'accès aux soins et la prévention soient des

facteurs importants. La majorité des décès liés à l'asthme pourrait ainsi être évitée grâce à un diagnostic plus précoce, une meilleure prise en charge et le développement d'une éducation thérapeutique [2].

Concernant la France, on estime à plus de 3 millions le nombre d'asthmatiques dont 1/3 sont âgés de moins de 15 ans. D'après l'Institut de veille sanitaire, il y a encore chaque année, 1000 asthmatiques qui décèdent de leur asthme (Figure 2).

Figure 2 : Taux standardisés de mortalité par asthme, tous âges, France métropolitaine, 1990-1999 et 2000-2010.



(Source CépiDC-Inserm, Standardisation : population France 2006, <http://www.invs.sante.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-chroniques-et-traumatismes/Asthme/Surveillance-epidemiologique-de-l-asthme-en-France>)

Facteurs de risques

Il existe plusieurs facteurs de risques capables d'influencer le développement de l'asthme [2]. Ces facteurs de risques sont divisés en facteurs hôte et facteurs environnementaux :

- Facteurs hôte : génétiques (terrain atopique, prédisposition à l'hyperréactivité des voies aériennes), sexe, obésité.
- Facteurs environnementaux : allergènes d'intérieur (acariens domestiques, phanères d'animaux, blattes, champignons, moisissures, levures), allergènes d'extérieur (pollens, champignons, moisissures, levures), infections (majoritairement virales), sensibilisateurs professionnels (= polluants sur le lieu de travail), la fumée de cigarette (fumeurs passif ou actif), la pollution de l'air, l'alimentation.

Coût

Le coût économique de l'asthme est considérable, que ce soit en terme de coût médical direct (hospitalisation, médicaments) ou indirect (absentéisme professionnel ou scolaire, mort précoce). Il se chiffrerait à 1.5 milliard d'euros chaque année en France [4].

I – A – 1 – b. Diagnostic, traitements et classification

Diagnostic

Les signes cliniques de l'asthme sont principalement la toux sèche, les sifflements et l'essoufflement spontané ou à l'exercice, associés à une gêne respiratoire à l'expiration. Cependant, ces symptômes ne sont pas spécifiques de l'asthme. Le diagnostic de l'asthme doit donc être confirmé par une exploration fonctionnelle respiratoire (EFR). Sans cet examen, beaucoup d'asthmatiques sont sous-diagnostiqués, ce qui représente un réel problème dans la prise en charge thérapeutique. De plus, l'EFR permet de quantifier l'existence d'un déficit fonctionnel et d'apprécier ainsi l'une des caractéristiques de la sévérité de l'asthme.

EFR

L'exploration fonctionnelle d'un asthmatique comporte principalement la spirométrie avec test de réversibilité ou test de provocation, que l'on pourra compléter par une pléthysmographie.

Lors d'une expiration forcée, la spirométrie permet de mesurer les volumes mobilisables et d'obtenir une courbe débit/volume [5]. L'allure de cette courbe et la mesure des paramètres suivants permettent en général de poser le diagnostic d'obstruction et d'apprécier sa sévérité :

- VEMS : volume expiratoire maximal par seconde ; il reflète la sévérité du déficit fonctionnel ventilatoire
- CVF : capacité vitale forcée
- Rapport VEMS/CVF (Normal > 0.7)

- $DEMM_{25-75}$: Débit expiratoire maximal moyen entre 25 % et 75 % de la CVF ; il reflète l'obstruction des voies aériennes distales quand le VEMS est normal
- DEP : Débit expiratoire de pointe

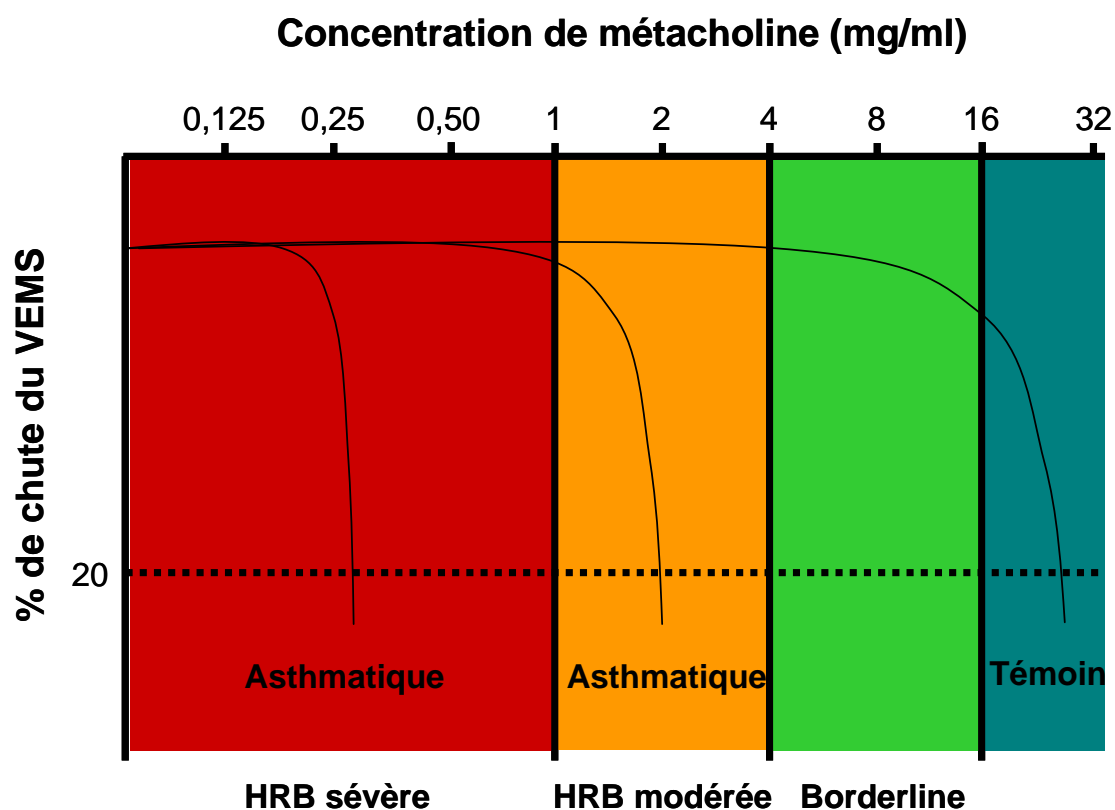
La réversibilité de l'obstruction bronchique est définie par une augmentation du VEMS supérieure à 12 % et supérieure à 200 ml en valeur absolue, après administration d'un bronchodilatateur d'action rapide [2]. Chez l'asthmatique, l'obstruction est classiquement réversible mais une absence de réversibilité peut être objectivée en cas de remodelage bronchique chez certains asthmatiques sévères [1]. Les autres paramètres de la courbe débit-volume peuvent éventuellement être pris en compte.

L'une des caractéristiques de l'asthme étant le caractère variable des symptômes en fonction du temps chez un même individu, ces mesures doivent être répétées [6]. La mesure du DEP peut être faite par le malade lui-même grâce à un débitmètre de pointe. Elle permet de suivre le débit bronchique dans le temps et de mettre en évidence une variabilité supérieure à 20 %, caractéristique de l'asthme. De plus, l'évaluation du DEP peut aider à confirmer le diagnostic d'asthme ainsi qu'à contrôler la maladie, notamment chez les personnes qui ont une faible perception des symptômes [2].

La pléthysmographie corporelle totale permet en plus, de mesurer les volumes pulmonaires non mobilisables, notamment le VR (volume résiduel) ainsi que les résistances des voies aériennes à l'écoulement de l'air. Une augmentation du VR au détriment de la capacité vitale indique l'existence d'une distension pulmonaire relative pouvant être liée à l'existence d'une obstruction des voies aériennes les plus distales, et dont la réversibilité doit être également recherchée. L'augmentation des résistances des voies aériennes est un indice d'obstruction proximale et, là aussi, sa réversibilité doit être évaluée.

Cependant, en dehors des crises d'asthme, l'EFR au repos est souvent normale. Il est alors possible de faire un test de provocation, afin de rechercher l'existence d'une HRB. En pratique clinique, les tests de provocation pharmacologique sont préférentiellement utilisés, le plus souvent en utilisant la méthacholine [7]. L'inhalation de concentrations croissantes et cumulées de méthacholine, permet alors de quantifier la réactivité bronchique. Ainsi, chez le sujet normal, la concentration nécessaire et suffisante pour engendrer une chute de 20% du VEMS, ou PC20 (Provocative Concentration), est supérieure ou égale à 16 mg/ml, alors qu'elle est inférieure à 4 mg/ml chez un sujet avec une HRB modérée et inférieure à 1 mg/ml dans les HRB sévères [7 , 8] (Figure 3).

Figure 3 : Critères de sévérité de l'hyperréactivité bronchique



Le test de provocation peut être réalisé à l'aide d'autres stimuli comme décrit plus tard dans le tableau 4.

La mesure de la composante inflammatoire lors d'une EFR n'est pas obligatoire pour le diagnostic de la maladie, mais elle permet dans certains cas de suivre l'effet des traitements [2]. Il existe aujourd'hui une technique validée qui permet d'évaluer de manière non invasive et répétée, le degré d'inflammation éosinophilique des voies aériennes. Il s'agit de la mesure du monoxyde d'azote (NO) dans l'air expiré [9]. Cette dernière a retenu l'attention de nombreuses équipes et différentes études ont montré la pertinence clinique de sa mesure dans l'asthme. En effet, le NO est une molécule endogène régulatrice et ubiquitaire de l'organisme. Il est produit par différentes cellules dans l'arbre bronchique, notamment en grande quantité par les éosinophiles. L'analyse de la fraction de NO dans l'air expiré représente ainsi une possibilité d'apprécier le niveau d'inflammation éosinophilique des voies aériennes [10]. D'une part, des niveaux élevés de NO expiré ont été largement démontrés chez des patients asthmatiques [11, 12] et, d'autre part, la concentration de NO est corrélée avec l'inflammation éosinophile dans les crachats [13]. Une autre façon d'évaluer le niveau de l'inflammation et d'avoir une vue plus générale sur le profil inflammatoire est l'analyse cytologique dans les expectorations induites [14]. Cette technique est moins utilisée car plus contraignante que la mesure du NO et certains patients ne parviennent pas à produire d'expectoration. L'utilisation de biopsies et/ou du lavage broncho-alvéolaire (LBA), réalisés lors d'une fibroscopie bronchique, se limitent à la recherche clinique.

Allergies

En raison de la forte association entre l'asthme et la rhinite allergique [15], la présence d'allergies chez des patients avec des symptômes respiratoires augmente la probabilité de diagnostiquer l'asthme. La détection d'une sensibilisation allergique (par des tests cutanés ou des dosages d'IgE spécifiques dans le sérum) peut aider à identifier les facteurs de risques qui causent les symptômes de l'asthme chez ces patients.

Traitements et classification

L'asthme est une maladie qui ne bénéficie actuellement d'aucun traitement curatif et peut être dans certains cas particulièrement invalidante. Les médicaments actuellement utilisés ont pour but de maintenir le contrôle de la maladie et de soulager les symptômes. Les deux principaux types de traitement de l'asthme sont les bronchodilatateurs et les anti-inflammatoires. Les bronchodilatateurs, principalement les β_2 -agonistes, vont permettre une relaxation du muscle lisse bronchique et ainsi diminuer l'obstruction bronchique. Parmi les anti-inflammatoires, les glucocorticoïdes sont largement utilisés pour diminuer l'inflammation des voies aériennes [16]. D'autres traitements sont également utilisés. Selon le GINA, les médicaments utilisés pour le traitement de l'asthme peuvent être classés en deux groupes. D'une part, les médicaments de contrôle, qui incluent les corticostéroïdes inhalés, les anti-leucotriènes, les β_2 -agonistes de longue durée d'action et les anti-IgE. D'autre part, les médicaments dits "de la crise", notamment les β_2 -agonistes et les anti-cholinergiques de courte durée d'action. Par ailleurs, le traitement administré aux patients asthmatiques doit également être pris en compte dans la classification de l'asthme.

En effet, selon le GINA, la classification des patients asthmatiques s'est initialement basée sur les symptômes et l'obstruction (Tableau 1) [17]. Cependant, cette classification n'était applicable que pour des patients naïfs de traitement.

Tableau 1 : Classification de l'asthme en fonction des paramètres cliniques et fonctionnels ventilatoires.

	STADE 1 Intermittent	STADE 2 Persistant léger	STADE 3 Persistant modéré	STADE 4 Persistant sévère
Symptômes	< 1/sem	> 1/sem < 1/jour	Quotidiens	Quotidiens
Exacerbations	Brèves	Retentissement sur l'activité et le sommeil	Retentissement sur l'activité et le sommeil	Fréquentes
Symptômes nocturnes	< 2/mois	> 2/mois	> 1/sem	Fréquentes
Autres			Utilisation quotidienne de β_2 agoniste	Limitation des activités physiques
VEMS-DEP % théorique	$\geq 80\%$	$\geq 80\%$	60-80%	$\leq 60\%$
Variabilité VEMS-DEP	< 20%	20-30%	> 30%	< 30%

Plus tard, la classification des niveaux de sévérité de l'asthme en fonction de la charge thérapeutique nécessaire et des symptômes a été proposée (Tableau 2) [17].

Tableau 2 : Classification de l'asthme en fonction de la charge thérapeutique et des symptômes.

STADE 1	STADE 2	STADE 3	STADE 4
Pas de traitement de fond	CI (faible dose)	CI (dose faible à moyenne) + LABA	CI (forte dose) + LABA + autre

		Charge thérapeutique			
		STADE 1	STADE 2	STADE 3	STADE 4
Symptômes	STADE 1	Intermittent	Persistant léger	Persistant modéré	Persistant sévère
	STADE 2	Persistant léger	Persistant modéré	Persistant sévère	Persistant sévère
	STADE 3	Persistant modéré	Persistant sévère	Persistant sévère	Persistant sévère
	STADE 4	Persistant sévère	Persistant sévère	Persistant sévère	Persistant sévère

Légende : CI : Corticoïdes Inhalés, LABA : β -2 agonistes de longue durée d'action

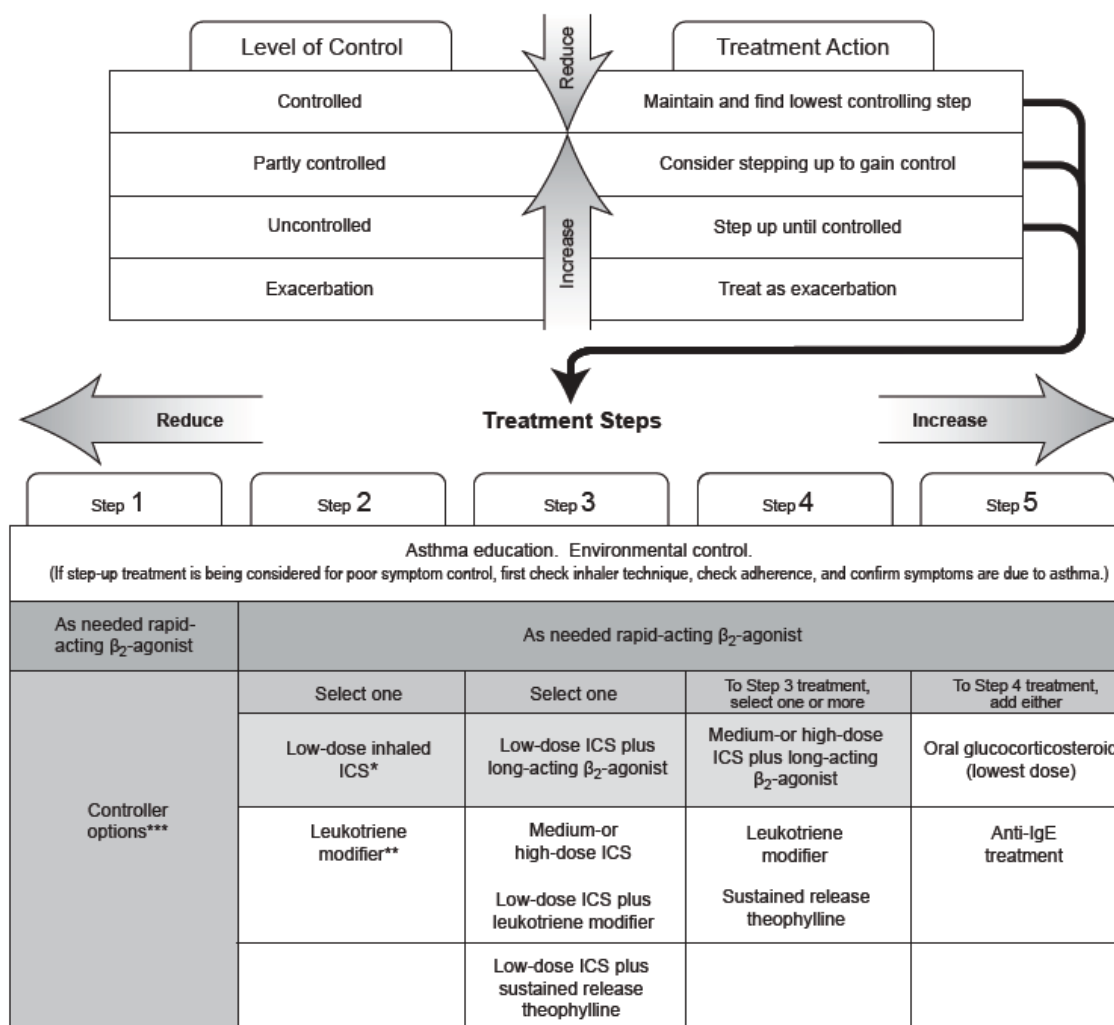
En effet, il est important de noter que la sévérité de l'asthme implique non seulement l'importance des symptômes mais également la réponse au traitement. Ainsi, l'asthme peut se manifester par des symptômes très invalidants et une obstruction bronchique, mais devenir complètement contrôlé avec un traitement à faible dose. Cependant, cette deuxième classification avait tendance à surestimer l'asthme sévère. Par conséquent, la dernière classification de l'asthme est actuellement basée sur le contrôle de la maladie permettant une optimisation des traitements (tableau 3) [2].

Tableau 3 : Classification de l'asthme en fonction du contrôle de la maladie.

	CONTRÔLÉ	PARTIELLEMENT CONTRÔLÉ	NON CONTRÔLÉ
Symptômes diurnes	Aucun ($\leq 2/\text{sem}$)	$> 2/\text{sem}$	≥ 3 éléments caractérisant un asthme partiellement contrôlé lors d'une même semaine
Limitations des activités	Aucune	Au moins 1	
Symptômes nocturnes	Aucun	Au moins 1	
Recours à une médication de secours	Aucun ($\leq 2/\text{sem}$)	$> 2/\text{sem}$	
DEP ou VEMS	Normal	$< 80\%$	
Exacerbations	Aucune	$\geq 1/\text{an}$	1/sem

Après identification des symptômes, les médecins vont donc administrer le traitement le plus approprié. Le GINA recommande l'utilisation d'un système à 5 paliers thérapeutiques d'intensité croissante (Figure 4). Ainsi, en fonction du niveau de contrôle, le médecin peut diminuer ou augmenter progressivement la pression thérapeutique [2].

Figure 4 : Approche thérapeutique de l'asthme basée sur le contrôle de la maladie.



* ICS = inhaled glucocorticosteroids

**= Receptor antagonist or synthesis inhibitors

*** = Recommended treatment (shaded boxes) based on group mean data. Individual patient needs, preferences, and circumstances (including costs) should be considered.

Alternative reliever treatments include inhaled anticholinergics, short-acting oral β_2 -agonists, some long-acting β_2 -agonists, and short-acting theophylline. Regular dosing with short and long-acting β_2 -agonists is not advised unless accompanied by regular use of an inhaled glucocorticosteroid.

(issue du GINA, mars 2013)

I – A – 1 – c. L’asthme sévère

La terminologie autour de la sévérité de l'asthme est imprécise car elle a souvent été utilisée pour décrire l'amplitude de l'obstruction bronchique ou l'intensité des symptômes (cf ancienne classification GINA). Cependant, la sévérité est définie à travers le temps, après des mois, voire des années d'évolution de la maladie.

La première définition de l'asthme sévère ou réfractaire a été publiée en 2000 par l'ATS [6]. Elle repose sur l'existence d'au moins 1 critère majeur et 2 critères mineurs.

Critères majeurs :

- Soit une corticothérapie orale continue ou semi-continue (>50% de l'année),
- Soit une corticothérapie inhalée à forte dose,
- Soit les 2,

pour tenter d'obtenir le contrôle de l'asthme.

Critères mineurs :

- Nécessité d'un traitement de fond comportant : β 2-agonistes de longue durée d'action, théophylline, leucotriènes en plus des corticoïdes inhalés.
- Prise quotidienne, ou presque quotidienne, de β 2-agonistes d'action rapide.
- Obstruction permanente des voies aériennes (VEMS<80% ; variabilité du DEP>20%).
- Au moins 1 consultation en urgence par an pour asthme.
- Au moins 3 cures courtes de corticoïdes oraux par an.
- Aggravation rapide lorsque l'on diminue d'au moins 25% les doses de corticoïdes.
- Antécédent d'asthme presque fatal

À la lecture de ces critères, plusieurs commentaires s'imposent : (i) la notion de sévérité ne se conçoit que pour des patients asthmatiques traités par des corticoïdes oraux ou par de fortes doses de corticoïdes inhalés ; (ii) selon les critères mineurs associés, plusieurs phénotypes d'asthme sévère sont possibles comme l'asthmatique sévère avec obstruction bronchique chronique, l'exacerbateur fréquent, l'asthmatique non contrôlé en permanence, ou l'asthmatique cortico-résistant.

La notion de contrôle de la maladie prend en considération les effets du traitement sur les symptômes et la fonction respiratoire sur une durée d'une à plusieurs semaines. Dans cette optique, plusieurs mesures standardisées ont été développées et validées, notamment l'"Asthma Control Questionnaire" (ACQ) (<http://www.qoltech.co.uk/acq.html>) de Juniper [18 , 19] et l'"Asthma Control Test" (<http://www.asthmacontroltest.com/>) [20] qui permettent de mesurer le contrôle de l'asthme de façon reproductible. Toutefois, l'estimation du contrôle de la maladie doit également tenir compte de la survenue d'exacerbations.

Une nouvelle classification de l'asthme sévère est en cours de production par l'« ERS/ATS task force ».

L'asthme sévère est cependant confirmé après l'exclusion des diagnostics différentiels comme la BPCO (Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive) chez l'adulte, ou la mucoviscidose chez l'enfant, après traitement optimal des exacerbations et des comorbidités et vérification de la bonne observance des traitements.

Dans ces conditions, 10% des patients asthmatiques sont considérés comme sévères, et nécessitent le niveau 5 de traitement pour contrôler leur maladie selon le GINA. Bien souvent, les symptômes persistent malgré ce traitement maximal [6]. Ces patients asthmatiques sévères ont des symptômes variables, le plus souvent invalidants. Ils présentent souvent un remodelage bronchique majeur qui met en jeu une augmentation de la masse du muscle lisse bronchique et qui, actuellement, ne répond à aucune thérapeutique, comme les β_2 -agonistes ou

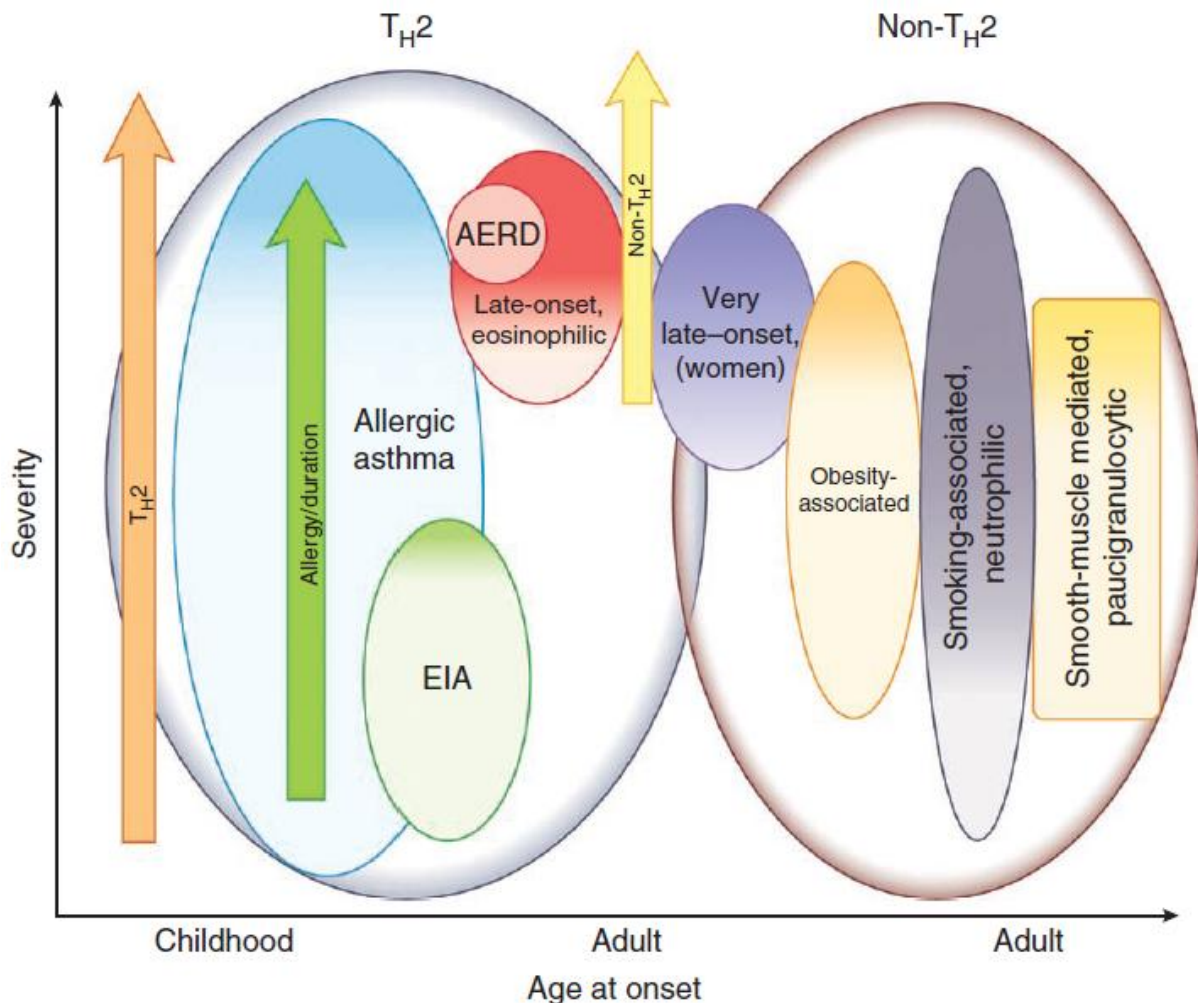
les glucocorticoïdes y compris par voie générale. L'efficacité des nouveaux traitements, anti-IgE (Omalizumab) [21], anti-IL-5 (Mepolizumab) [22], anti-IL-13 (Lebrikizumab) [23], anti-IL-4R α (Dupilumab) [24] semble être satisfaisante pour certains endotypes de patients, néanmoins leur efficacité sur le remodelage bronchique et notamment sur le remodelage musculaire lisse bronchique doit encore être évaluée. De nouvelles thérapies visent aussi l'inflammation Th17, fortement associée à l'asthme sévère neutrophilique [25]. Ainsi, de nouveaux anticorps neutralisant la signalisation IL-17A ou IL-17RA (récepteur de l'IL-17A) sont en cours d'essais clinique ([http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01478360?term = AIN+457+and+asthma&rank=1](http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01478360?term=AIN+457+and+asthma&rank=1)). La thermoplastie bronchique, qui vise à supprimer l'excès de masse musculaire lisse bronchique, semble être une piste thérapeutique prometteuse dans l'asthme sévère. Wechsler et al. ont montré sur une étude de 5 ans que la thermoplastie bronchique diminue le nombre d'exacerbations et d'hospitalisations [26]. En plus d'être invalidant pour le patient, l'asthme sévère génère la moitié des coûts de l'asthme en termes de santé publique. Ainsi, le coût moyen d'un asthmatique sévère est multiplié par 6 par rapport aux asthmatiques non sévères [2].

Phénotypes / Endotypes

L'hétérogénéité observée dans l'asthme sévère conduit à identifier plusieurs phénotypes de la maladie [27]. Un phénotype est défini comme « les propriétés observables d'un organisme qui sont produites par l'interaction du génotype et de l'environnement ». Le concept de phénotype a été proposé pour être le prélude au concept d'endotype, dans lequel une voie biologique spécifique est identifiée pour expliquer les propriétés observables du phénotype. A ce jour, plusieurs endotypes ont été proposés [28], mais plusieurs études sont encore nécessaires pour mieux les caractériser puis finalement les valider (Figure 5) [29].

A terme, en identifiant plus précisément le phénotype/endotype de l'asthmatique, on se dirigera vers une thérapie beaucoup plus personnalisée.

Figure 5 : Groupement théorique des phénotypes d'asthmes émergents basé sur la distinction entre asthme Th2-high et asthme non-Th2.

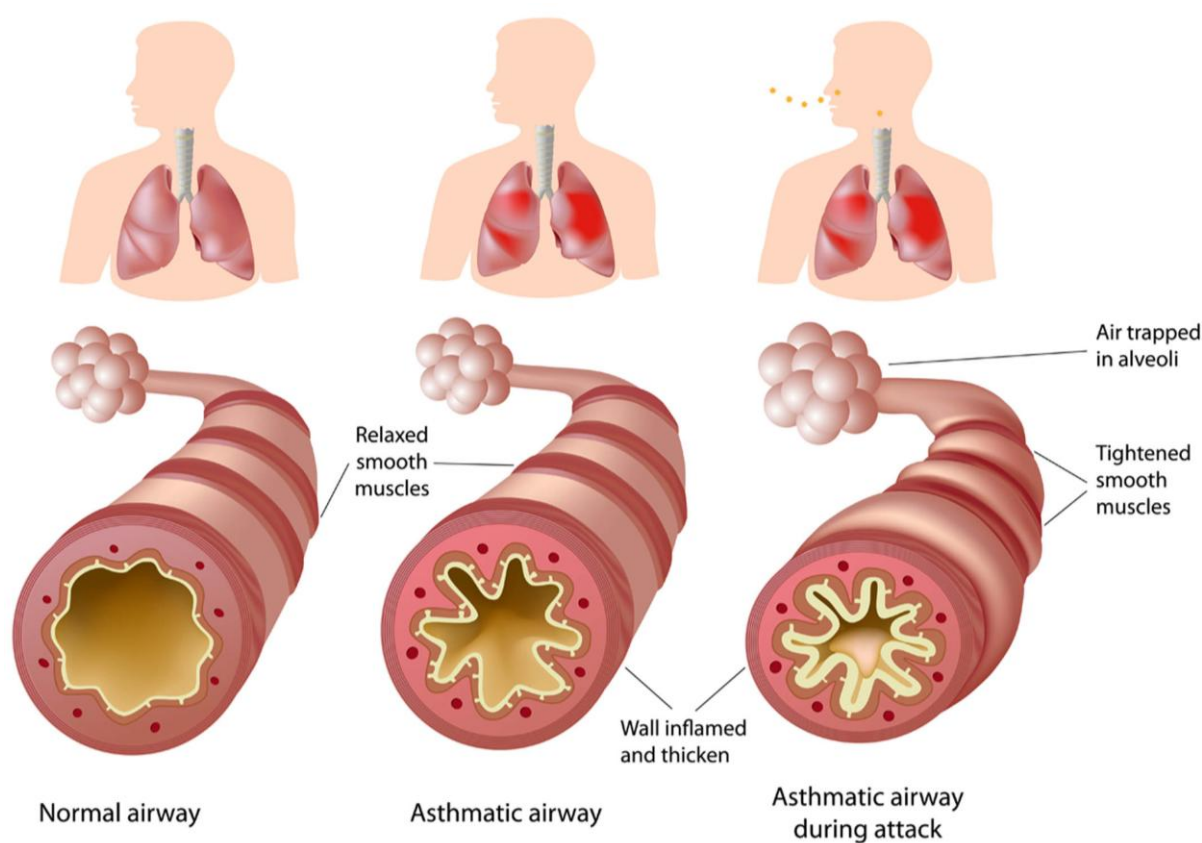


Légende : L'asthme Th2 consiste à la fois en une maladie développée pendant l'enfance (early-onset) et en une maladie développée à l'âge adulte (late-onset), avec différents degrés de sévérité. Il semblerait que les asthmes allergiques jeunes (early-onset allergic asthma) soient légers mais qu'une augmentation complexe des processus immunitaires conduise à une plus grande sévérité. L'asthme éosinophilique tardif (later-onset eosinophilic asthma) sans éléments allergiques traditionnels est plus sévère, alors que l'EIA (Exercice-Induced Asthma) est une forme plus légère de l'asthme Th2. L'asthme non-Th2 inclut l'asthme très tardif (very late-onset), l'asthme associé à l'obésité aussi bien qu'aux fumeurs, l'asthme neutrophilique et l'asthme dans lequel les malades montrent peu d'inflammation. L'intensité des couleurs représente le degré de sévérité ; la taille des cercles représente les proportions relatives d'individus affectés. (d'après S Wenzel, *Nature Med* 2012)

I – A – 2 – Les caractéristiques de l’asthme

La physiopathologie de l’asthme est caractérisée par 3 composantes majeures : l’hyperréactivité, l’inflammation et le remodelage bronchique. La connaissance des mécanismes impliqués dans ces trois phénomènes est essentielle à la compréhension de la pathogénie de l’asthme et aux modalités de sa prise en charge thérapeutique (Figure 6).

Figure 6 : Schéma de bronche d’un sujet sain, d’asthmatique et d’asthmatique durant une crise d’asthme.



Légende : Epaissement et inflammation de la paroi bronchique chez l’asthmatique. (<http://bcrt.ca/2013/06/07/canadian-asthma-consensus-guidelines-2-0-1-2-u-p-d-a-t-e/>)

I – A – 2 – a. Hyperréactivité bronchique

Définition

La réactivité bronchique physiologique traduit l'aptitude des voies aériennes de sujets sains à développer une obstruction bronchique limitée en réponse à une forte stimulation. L'HRB se définit donc comme une réponse « excessive » ou « démesurée » des voies aériennes à une grande variété de stimuli, qu'ils soient physiques, chimiques ou pharmacologiques, par rapport à la réponse des sujets sains.

Il est habituel de distinguer d'une part, l'HRB non spécifique, anomalie constamment retrouvée dans l'asthme et, d'autre part, l'HRB spécifique d'un allergène, présente uniquement chez les asthmatiques allergiques.

HRB non spécifique

Les stimuli susceptibles d'induire une HRB non spécifique peuvent être directs ou indirects [30] (Tableau 4). Les stimuli directs agissent sans intermédiaire sur l'effecteur principal de la réponse bronchique (*i.e.* le muscle lisse) par la stimulation d'un récepteur membranaire de la CML. Ainsi, la métacholine et l'histamine activent respectivement les récepteurs de type M3 et H1. Les stimuli indirects impliquent, quant à eux, une ou plusieurs voies intermédiaires aboutissant, généralement, à la libération de médiateurs bronchoconstricteurs par les cellules inflammatoires, telles que le mastocyte. Ainsi, l'exercice physique abrupt générant une hyperventilation à l'origine d'une déshydratation et d'une hypothermie de l'air inhalé, va permettre la contraction indirecte du muscle lisse bronchique par la sécrétion de médiateurs inflammatoires mastocytaires, comme l'histamine ou les leucotriènes [8, 31], ainsi qu'une stimulation de la voie cholinergique libérant de l'acétylcholine endogène.

Tableau 4 : Liste des principaux stimuli utilisés pour rechercher une hyperréactivité bronchique non spécifique.

Stimulus		Mécanisme d'action
Pharmacologique	Métacholine	Direct
	Histamine	Direct
Physique	Exercice abrupte	Indirect
	Air froid	Indirect
	Hyperventilation	Indirect
	Solution hypo-osmolaire	Indirect
Chimique	Adénosine	Indirect
	Mannitol	Indirect

Quel que soit le mécanisme impliqué, la réponse bronchique peut être mesurée et quantifiée, comme cela a été décrit dans le chapitre I.A.1.b. En revanche, si tous les asthmatiques ont une HRB non spécifique, elle se retrouve également chez certains patients rhinitiques ou atteints de BPCO [32]. La mesure répétée de l'HRB a été proposée comme outil de suivi des patients asthmatiques, car elle serait corrélée à la sévérité de l'asthme et à son contrôle. Toutefois, les données actuelles basées sur des études longitudinales, ne recommandent pas son utilisation dans le suivi des patients asthmatiques. Les critères de sévérité de l'HRB (borderline, modérée ou sévère) sont présentés dans la figure 2 (cf chapitre I.A.1.b.) et sont calculés en fonction de normes prédéfinies [6].

HRB spécifique

L'HRB spécifique est induite par l'inhalation de l'allergène vis à vis duquel le patient est spécifiquement sensibilisé. Sa mesure n'est toutefois réservée qu'aux essais cliniques ou à la recherche de pathologie professionnelle, car la stimulation spécifique par un allergène peut potentialiser l'HRB non spécifique, et donc majorer la sévérité de la maladie. Cette réponse spécifique comporte deux phases : une phase précoce et une phase retardée.

Phase précoce

Elle survient dans les minutes suivant la stimulation et résulte de la dégranulation IgE-dépendante des mastocytes. Ceux-ci libèrent des médiateurs bronchoconstricteurs tels que l'histamine, les prostaglandines ou les leucotriènes. L'amplitude de cette phase précoce est corrélée à la masse musculaire lisse bronchique et, par conséquent, à l'intensité du remodelage musculaire lisse bronchique [33]. En effet, le remodelage bronchique conduit à une réduction du calibre bronchique qui va alors mécaniquement provoquer une augmentation des résistances à l'écoulement de l'air dans la bronche [34]. De plus, la réponse contractile sera plus importante dans une bronche remodelée dont la masse musculaire lisse est augmentée [35].

Phase tardive

Elle survient 3h à 8h après la stimulation allergénique, chez environ 50% des patients, et semble d'avantage liée à l'inflammation qu'au remodelage bronchique [36 , 37 , 38]. En effet, une corrélation positive a été retrouvée entre la concentration des cellules inflammatoires (éosinophiles et mastocytes) dans le LBA de patients asthmatiques et l'intensité de cette réponse obstructive bronchique tardive [39]. L'implication de l'inflammation dans la phase tardive de l'HRB spécifique est également confortée par des arguments d'ordre pharmacologique. En effet, différents traitements à visée anti-inflammatoire diminuent cette phase retardée [40]. C'est le cas des corticoïdes, des bloqueurs de CD11a, ou d'anticorps anti-IL4 bloquants, ces deux dernières molécules étant impliquées dans le recrutement des cellules inflammatoires [41 , 42].

I – A – 2 – b. Inflammation bronchique

L'asthme est une maladie inflammatoire des voies aériennes. L'inflammation bronchique se caractérise par une infiltration polymorphe de l'ensemble de la paroi bronchique par différentes cellules inflammatoires, entraînant des changements physiopathologiques [43]. Cette réaction inflammatoire implique une étape d'initiation, sous la dépendance des cellules dendritiques [44], qui ne sera pas détaillée dans cette thèse, et une étape effectrice impliquant la libération de multiples médiateurs par ces cellules inflammatoires, en particulier les lymphocytes T, les mastocytes et les polynucléaires éosinophiles. Une infiltration à neutrophiles, à l'instar de celle observée dans la BPCO, semble également jouer un rôle important chez certains asthmatiques sévères dont l'endotype implique les neutrophiles.

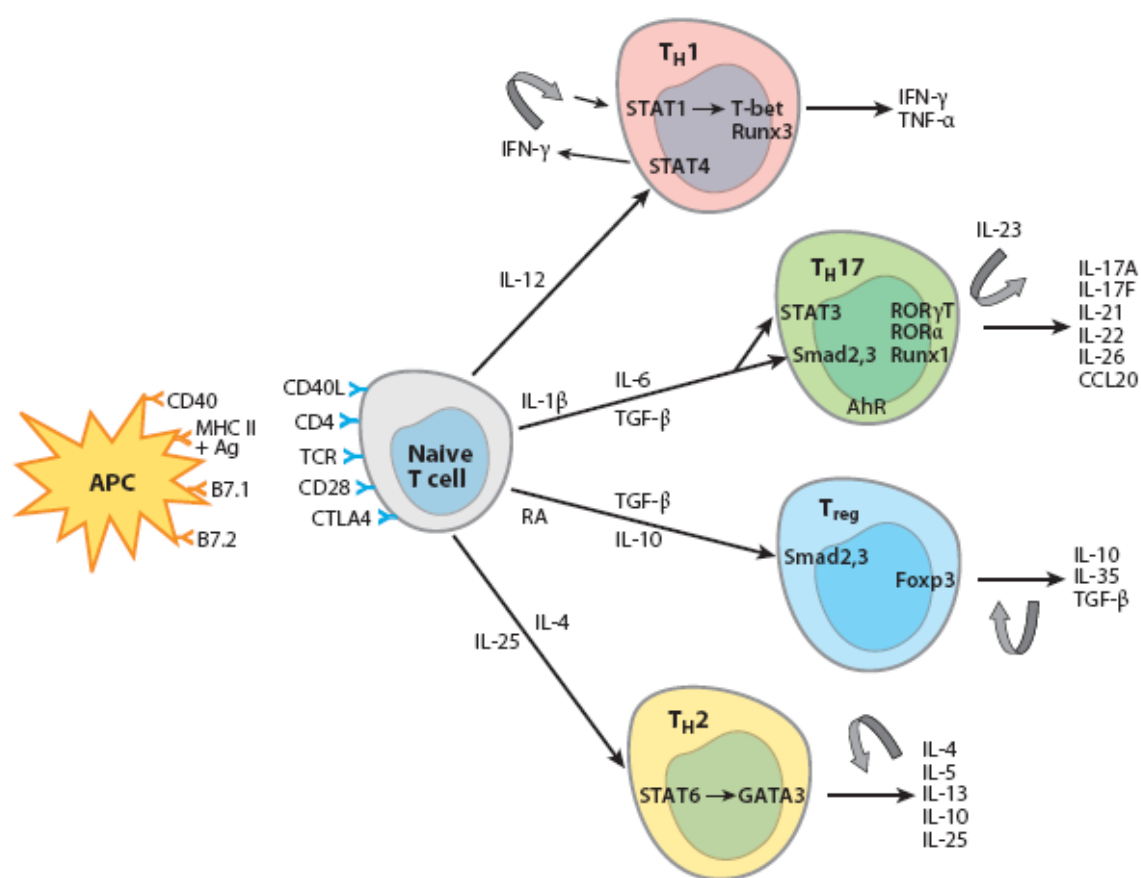
Lymphocyte T

Un important infiltrat de lymphocytes T est retrouvé dans la muqueuse bronchique des asthmatiques, mais également dans le muscle lisse bronchique [45 , 46]. L'adhérence des lymphocytes T aux CML augmente leur prolifération et contribuerait au remodelage [47].

Les travaux menés suite à la découverte en 1986 des lymphocytes Th1 et Th2 chez la souris [48], puis chez l'homme [49], ont conduit à promouvoir, de prime abord, le paradigme Th2 dans l'immunopathologie de l'asthme. En effet, initialement identifiés parmi les lymphocytes T CD4⁺, les lymphocytes Th2 produisent des cytokines comme l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13 (Figure 7). Ce profil particulier de sécrétion cytokinique a fait des lymphocytes Th2, majoritaires dans l'asthme, les cellules prévalentes dans l'organisation de la réponse allergique, puisque l'IL-4 et l'IL-13 sont responsables de la commutation isotypique des plasmocytes vers la synthèse d'IgE, tandis que l'IL-5 orchestre l'inflammation

éosinophilique. Le recrutement des lymphocytes Th2 dans la paroi bronchique implique principalement les récepteurs CCR3 et CCR4 [50]. La production des chimiokines CCL22 et CCL17, deux ligands de CCR4, est en effet augmentée chez l'asthmatique (Tableau 5).

Figure 7. Principales sous-populations lymphocytaires T et leurs cytokines impliquées dans la physiopathologie de l'asthme.



Légende : APC : Antigen-presenting cell ; Treg : Regulatory T cell.
(D'après Alcorn J.F. et al. ; Annu Rev Physiol 2010)

Tableau 5. Principales chimiokines et leurs récepteurs.

Ligands		XCR1	Récepteurs CCR										Récepteurs CXCR					CX ₃ CR1
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	
Famille C																		
XCL1	Lptn	X																
XCL2	SCM-1β	X																
Famille CC																		
CCL1	I-309									X								
CCL2	MCP-1			X														
CCL3	MIP-1α		X				X											
CCL4	MIP-1β						X											
CCL5	RANTES		X		X		X											
CCL7	MCP-3		X	X	X													
CCL8	MCP-2				X													
CCL11	Eotaxine				X													
CCL13	MCP-4			X	X													
CCL14	HCC-1		X															
CCL15	MIP-1δ		X		X													
CCL16	HCC-4		X															
CCL17	TARC					X				X								
CCL18	PARC									X								
CCL19	MIP-3β								X									
CCL20	MIP-3α							X										
CCL21	6Ckine								X									
CCL22	MDC					X												
CCL23	MPIF		X															
CCL24	Eotaxine-2				X													
CCL25	TECK										X							
CCL26	Eotaxine-3				X													
CCL27	CTACK											X						
Famille CX₃C																		
CXCL1	GROα												X	X				
CXCL2	GROβ												X	X				
CXCL3	GROγ												X	X				
CXCL4	PF4														X			
CXCL5	ENA-78												X	X				
CXCL6	GCP-2												X	X				
CXCL7	NAP-2													X				
CXCL8	IL-8												X	X				
CXCL9	MIG														X			
CXCL10	IP-10														X			
CXCL11	I-TAC														X			
CXCL12	SDF-1α/β															X		
CXCL13	BCA-1																X	
Famille CX₃C																		
CX ₃ CL1	Fractalkine																	X

Légende : Dans les colonnes ligands figurent la dénomination commune internationale et l'ancienne nomenclature des chimiokines. Les croix (X) représentent la possibilité pour un ligand de se fixer sur un récepteur donné.

La modulation de la balance Th1/Th2 en faveur d'une réponse inflammatoire de type Th2 est également étayée par le fait que les lymphocytes Th1, cellules notamment productrices d'IFN- γ (Interferon- γ), sont connus pour inhiber la prolifération des lymphocytes Th2 [48] (Figure 7). Par ailleurs, la réponse Th1 spécifique des infections virales ou bactériennes semble avoir un rôle protecteur dans l'asthme. En effet, les sujets sensibles aux infections bactériennes de type *Mycobacterium tuberculosis*, ayant une augmentation de la production de lymphocytes Th1, développent moins d'asthme [51]. De façon similaire, l'incidence de l'asthme est plus faible chez les patients atteints de sclérose en plaque ou d'autres maladies auto-immunes caractérisées par une surexpression des lymphocytes Th1 et de leurs cytokines [52, 53]. Cependant, certains travaux tendent également à démontrer l'existence d'une activation Th1 dans l'asthme [54]. En effet, une population de lymphocytes T productrice d'IFN- γ a été mise en évidence dans le sang périphérique chez l'asthmatique, atopique ou non, et est liée à l'HRB et à la sévérité de l'asthme [55]. Dans les expectorations induites, le nombre de ces lymphocytes T producteurs d'IFN- γ est, par ailleurs, d'autant plus important que les asthmatiques sont symptomatiques [56].

Des études récentes soulignent l'importance des cytokines TSLP (thymic stromal lymphopoietin), IL-33 et IL-25, produites par l'épithélium sensibilisé par des allergènes ou par des helminthes, dans l'orientation d'une inflammation Th2 [57]. Dans cette inflammation, on retrouve les lymphocytes Th2, mais aussi les ILC2 (cellules lymphoïdes innées de type 2), qui sont une autre source de cytokines Th2. Parmi ces ILC2, les nuocytes ont été identifiés dans les voies aériennes, comme producteurs d'IL-13 après stimulation par l'IL-33[58].

Le rôle des lymphocytes T dans l'asthme ne se restreint pas au classique paradigme Th1/Th2. En effet, une autre sous-population lymphocytaire T CD4⁺, les lymphocytes T régulateurs (Treg), est également impliquée dans l'asthme et semblerait être garante d'un état non inflammatoire [59]. Parmi les Treg, le rôle présumé des lymphocytes NK-T (Natural

killer T cells) demeure controversé dans l'étiopathogénie de la maladie asthmatique [60 , 61]. En revanche, d'autres Treg caractérisés par l'expression à leur surface du CD4, du CD25 et du facteur de transcription FoxP3 (Forkhead box P3), sont capables de diminuer la réponse inflammatoire Th2 et, par conséquent, l'activation des éosinophiles et la production d'IgE [62]. Un déficit de ces Treg a ainsi été retrouvé dans le sang périphérique et les LBA de patients asthmatiques [63 , 64]. Le traitement par glucocorticoïdes augmente leur expression, par un mécanisme FoxP3-dépendant [65]. Les mécanismes à l'origine de cet effet protecteur des Treg sont encore mal connus, mais pourraient être liés à leur stimulation par le TGF- β (Transforming growth factor- β) et l'IL-10 [66] (Figure 7).

Plus récemment, l'implication d'une autre sous-population de lymphocytes T CD4⁺, les Th17, a été mise en évidence et pourrait participer à l'inflammation neutrophilique observée chez certains asthmatiques sévères [67] (Figure 7). En effet, les cytokines produites par les Th17 (IL-17A, IL-17F) induisent la production d'IL-8 (CXCL8) par les cellules épithéliales, les cellules musculaires lisses et les fibroblastes bronchiques [68 , 69], stimulant le recrutement de neutrophiles. De plus, l'IL-17A et l'IL-17F favorisent l'hyperréactivité et le remodelage bronchique en induisant la contraction, la migration et la prolifération des CML [70 , 71 , 72].

Ainsi, la conception dichotomique où deux populations lymphocytaires antagonistes, les Th1 et Th2, se disputaient l'orientation de la réponse immune dans l'asthme, a fait place à une orchestration plus complexe de la réaction inflammatoire faisant également intervenir les lymphocytes Treg et Th17 (Figure 7).

Mastocytes

Les mastocytes infiltrent l'ensemble de la paroi bronchique dans l'asthme, notamment l'épithélium, le chorion muqueux et les glandes muqueuses. Ils infiltrent, en outre, de façon spécifique, la couche musculaire lisse chez l'asthmatique [73].

Les mastocytes sont originaires de la moelle osseuse, à partir d'un précurseur CD34⁺, CD117⁺ et CD90⁺. Leur forme sanguine circulante est immature. Le recrutement des précurseurs mastocytaires dans la muqueuse bronchique se fait grâce à plusieurs chimiokines, telles que CCL5 (RANTES, Regulated on activation, normal T-cells expressed and secreted), CXCL8 (IL-8), CXCL10 (IP-10), CXCL1 (GRO- α , Growth regulated oncogene- α) et CX₃CL1 (Fractalkine), qui se fixent respectivement sur les récepteurs aux chimiokines CCR3, CXCR1, CXCR3, CXCR2 et CX₃CR1 (Tableau 5) [74 , 75 , 76]. Le recrutement de ces précurseurs implique également des facteurs tels que le SCF (Stem cell factor) ou le TGF- β . Ce dernier semble cependant être le facteur chimiotactique dont la sensibilité est la plus grande [77].

Une fois présents dans les tissus, les progéniteurs mastocytaires n'expriment plus le CD34, mais le récepteur aux IgE (Fc ϵ RI) et toujours le récepteur au SCF (CD117). Les IgE, par leur fragment Fc, peuvent se fixer avec une très haute affinité sur le Fc ϵ RI, entraînant alors la sensibilisation du mastocyte. Lorsqu'un mastocyte préalablement sensibilisé est mis en présence de l'allergène, la fixation des IgE spécifiques sur l'allergène entraîne une dimérisation du récepteur Fc ϵ RI et son activation, *via* une cascade de réactions intracellulaires, aboutissant *in fine* à la dégranulation mastocytaire. L'activation mastocytaire peut également être indépendante des IgE, comme être induite par des facteurs de croissance comme le SCF ou des cytokines.

La dégranulation des mastocytes entraîne la libération de nombreux médiateurs inflammatoires qui contractent le muscle lisse, majorent l'HRB, augmentent la masse

musculaire lisse, mais stimulent également la production de mucus par les cellules épithéliales [78 , 79]. Il est habituel de différencier les mastocytes en deux catégories, selon leur produit de dégranulation. Ainsi, les mastocytes de type T (MC_T) ne contiennent qu'une seule protéase, la tryptase, en faible quantité, tandis que les mastocytes de type TC (MC_{TC}) sécrètent de la tryptase en plus grande quantité mais aussi de la chymase, de la carboxypeptidase et de la cathepsine G [80]. Les mastocytes MC_{TC} sont majoritaires dans l'épithélium et le chorion muqueux des asthmatiques sévères, alors que le type MC_T est prépondérant dans la muqueuse bronchique des asthmatiques modérés [81].

Tryptase

La tryptase, sérine protéase de 135 kDa, représente donc le médiateur majoritaire synthétisé et sécrété par les mastocytes [82]. Les substrats de la tryptase sont peu nombreux et sont représentés par des peptides, tels que le VIP (Vasoactive intestinal peptide), le CGRP (Calcitonin gene related peptide) ou la vasopressine. Des concentrations élevées de tryptase ont ainsi été mesurées dans le LBA de patients asthmatiques [83]. Cette sérine protéase participe non seulement au contrôle du tonus et de la réactivité du muscle lisse des voies aériennes, mais également aux processus inflammatoires et de remodelage bronchique. En effet, elle potentialise la contraction induite par l'histamine sur des bronches canines [84] ou humaines [85], et peut induire un signal calcique transitoire [86]. Elle peut également agir de manière indirecte sur le muscle lisse *via* le système non adrénergique non cholinergique (NANC), d'une part en clivant et inactivant le VIP, neurotransmetteur bronchodilatateur et, d'autre part, en n'inactivant pas les tachykinines, substances impliquées dans la bronchoconstriction [87]. *In vivo*, l'inhalation de tryptase humaine provoque une bronchoconstriction et une HRB chez le mouton allergique [88]. De plus, le traitement par des inhibiteurs de la tryptase avant une stimulation allergénique diminue la réponse précoce et

retardée de l'HRB spécifique, l'HRB non spécifique et l'inflammation éosinophilique [89]. La tryptase a également un rôle pro-inflammatoire par le recrutement de polynucléaires neutrophiles et éosinophiles [90]. Par ailleurs, elle contribue aussi au remodelage bronchique en stimulant la prolifération des cellules épithéliales [91], des cellules endothéliales [92], des CML bronchiques humaines [93] et des fibroblastes [94]. En outre, elle induit le chimiotactisme des fibroblastes et augmente la synthèse et la sécrétion de collagène de type I [95].

Polynucléaires éosinophiles

La très grande majorité des asthmatiques présente une infiltration bronchique à polynucléaires éosinophiles [96]. Cependant, contrairement aux mastocytes et aux lymphocytes T, les éosinophiles n'infiltrant pas la couche musculaire lisse. En effet, la tryptase mastocytaire empêche leur recrutement par la CML, en clivant de manière sélective les chimiokines CCL11 (Eotaxine) et CCL5 (RANTES) [97] (Tableau 5).

Les polynucléaires éosinophiles sont originaires de la moelle osseuse, dérivés de précurseurs CD34⁺. Leur maturation se déroule également dans la moelle osseuse, notamment sous l'effet de l'IL-5 [98, 99]. L'essentiel de leur recrutement dans la muqueuse bronchique est dû à la production d'IL-5 par les lymphocytes Th2 et les mastocytes. L'IL-5 joue également un rôle essentiel dans la maturation, la différenciation et la survie des éosinophiles.

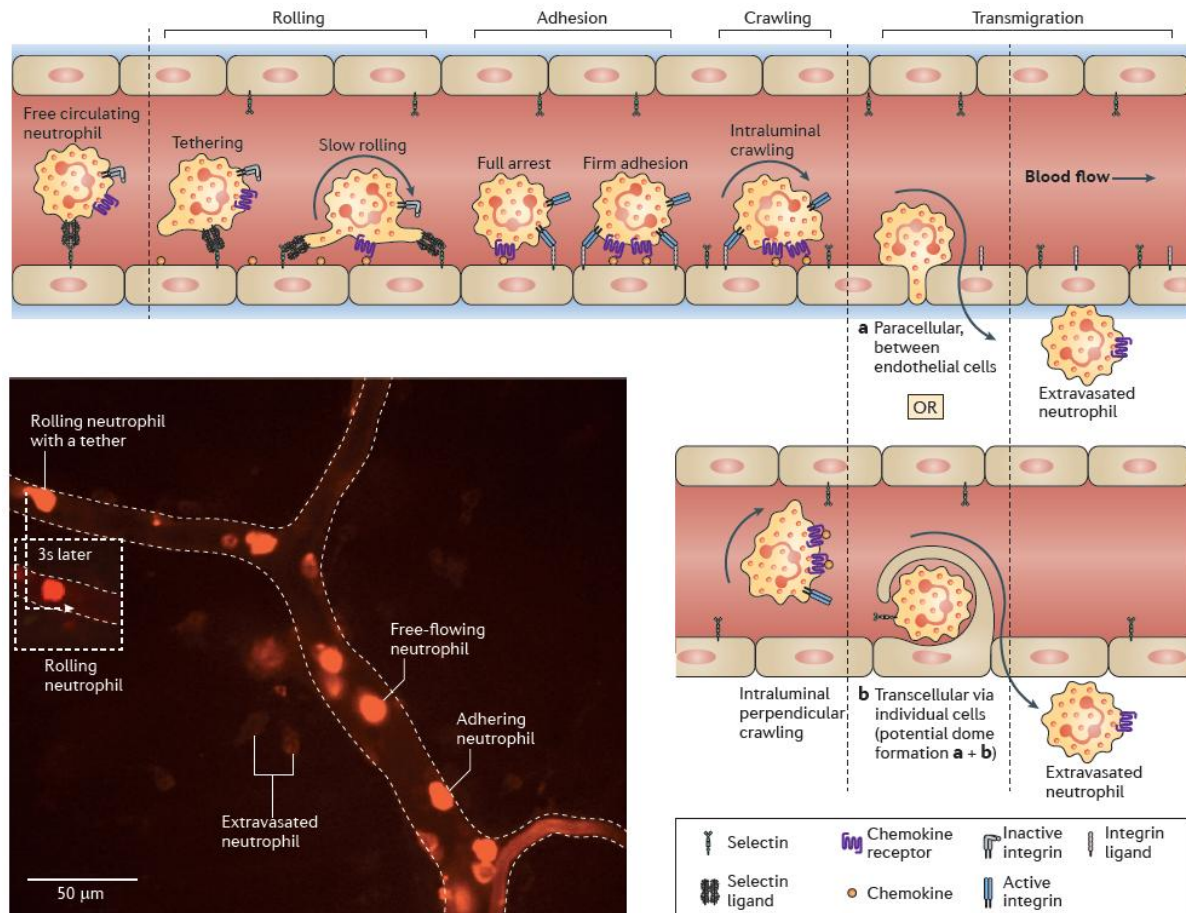
Les polynucléaires éosinophiles libèrent de nombreuses cytokines, comme l'IL-4 et l'IL-13, qui contribuent à la pérennisation de la réponse inflammatoire Th2 [100]. Ils sécrètent également des médiateurs impliqués dans la contraction musculaire lisse, comme les prostaglandines ou les leucotriènes, mais également dans l'HRB, comme la MBP (Major basic protein). Ils produisent en outre du TGF- β et de l'ECP (Eosinophil cationic protein), celle-ci contribuant à l'abrasion de l'épithélium bronchique [101], et par conséquent au remodelage bronchique.

Polynucléaires neutrophiles

L'infiltration de la paroi bronchique par des neutrophiles semble être une caractéristique de certains asthmes sévères [102 , 103]. En effet, plusieurs études révèlent que les neutrophiles sont augmentés dans les différents compartiments des voies aériennes et sont souvent associés à des données cliniques de la maladie. Ainsi, on observe une augmentation des neutrophiles dans le sang circulant, accompagné d'une augmentation de TNF- α et d'IL-8 chez les asthmatiques sévères [104]. Une augmentation des neutrophiles a aussi été observée dans les expectorations des asthmatiques sévères [102 , 105 , 106 , 107 , 108]. Dans l'étude de Shaw, l'inflammation neutrophilique est associée à un VEMS plus faible pré et post bronchodilatateur. Plus tard, l'étude de Contoli montrera que le déclin du VEMS est corrélé avec une augmentation des neutrophiles dans la BPCO ($r=0,49$; $P<0,05$) et des éosinophiles dans l'asthme ($r=0,53$; $P<0,05$) mais pas des neutrophiles. L'augmentation des neutrophiles est aussi retrouvée dans les LBA (Lavage Broncho-Alvéolaire) des asthmatiques sévères [109], et cette augmentation peut être induite par l'inoculation du rhinovirus HRV-16 chez des asthmatiques allergiques [110]. Finalement, les neutrophiles ont aussi été observés dans les biopsies bronchiques [109], notamment sous la membrane basale [111], au niveau de l'épithélium, avec une augmentation des neutrophiles lors d'exacerbations [112], et dans les glandes sous-muqueuses [78]. Aucune étude chez l'asthmatique sévère ne montre les neutrophiles en contact direct avec le muscle lisse bronchique. Seul deux études ont mis clairement cette interaction en évidence. La première a montré que les neutrophiles infiltrent le muscle lisse bronchique des BPCO et que l'infiltration neutrophilique est corrélée négativement avec le VEMS ($r=-0,51$; $P=0,01$) [113]. La seconde montre par microscopie électronique des neutrophiles en contact avec les faisceaux de muscle dans un modèle de souris sensibilisée à l'ovalbumine [114].

Les polynucléaires neutrophiles proviennent eux aussi de la moelle osseuse où se fait leur maturation. Ils sont recrutés dans la bronche à partir de leur forme sanguine déjà mature [115] par un mécanisme de transmigration (Figure 8). Ce recrutement nécessite la production locale de chimioattractants comme CXCL8 (IL-8) [116] qui se fixent sur les récepteurs CXCR1 et CXCR2 exprimés à la surface des neutrophiles (tableau 5) [117]. En plus de CXCL8, d'autres chimioattractants sont produits au cours de l'inflammation : des médiateurs lipidiques (LTB₄, PAF), des produits bactériens (fMLP), des fragments du complément (C5a), et des cytokines (ENA-78, G-CSF, GM-CSF, RANKL, RANTES, PF4, GRO- α - β - γ ...). Pour l'homéostasie des neutrophiles, l'axe CXCR4-CXCL12 permet le retour des neutrophiles vers la moelle osseuse pour y être éliminés. Dernièrement, un antagoniste de CXCR4 (plerixafor) a montré qu'il était capable d'inhiber ce retour [118].

Figure 8 : Cascade de recrutement des neutrophiles.



Légende : Description des étapes séquentielles du recrutement des neutrophiles des vaisseaux vers le tissu. Deux méthodes de transmigration sont connues : para-cellulaire (a. entre les cellules endothéliales) et trans-cellulaire (b. à travers les cellules endothéliales). Les groupes majeurs de molécules d'adhésion sont notés. Le roulement est souvent dépendant des sélectines, alors que l'adhésion, le rampeement et la transmigration dépendent des interactions avec les intégrines. Les chimiokines qui tapissent la partie luminale de l'endothélium activent le roulement des neutrophiles, ce qui induit le changement de conformation des intégrines à la surface du neutrophile, et permettent les étapes suivantes. Les neutrophiles rampent en suivant un gradient de chimiokines le long de l'endothélium, qui les guide vers les sites préférentiels de transmigration. L'image de microscopie intra-vitale montre une veinule postcapillaire de la peau avec des neutrophiles (cellules LY6G+) marqués avec un anticorps secondaire couplé à la phycoérythrine. L'image a été prise 2 heures après avoir infecté la peau de souris avec du *Staphylococcus aureus*. La capture d'image a été faite à différentes étapes de la migration des neutrophiles : cellules circulantes, cellules roulant avec de longues extensions, cellules adhérentes et cellules extravasées hors du vaisseau sanguin. (d'après Kolaczowska et Kubes, *Nature Immunology* 2013)

Les neutrophiles font partie des premières cellules à être recrutées sur les lieux d'une inflammation. Dans la lutte contre les pathogènes, ces cellules du système immunitaire inné possèdent trois armes principales. Le premier mécanisme de défense est bien connu, il s'agit de la phagocytose. Une fois le pathogène inclus dans les phagosomes, il est éliminé par la production d'espèces réactives dérivées de l'oxygène (ROS), et par des protéines antibactériennes (cathepsine, défensine, lactoferrine et lysozyme). Le deuxième mécanisme consiste à libérer ces agents de défense dans le milieu extracellulaire. Le troisième mécanisme est beaucoup plus original et consiste à libérer dans le milieu un réseau de filaments constitués d'ADN, de protéines (ex : lactoferrine et cathepsine) et d'enzymes (ex : myéloperoxydase et élastase), que l'on appelle NETs pour Neutrophil Extracellular Traps. Les NETs immobilisent les pathogènes, et facilitent leur phagocytose. Les NETs ont été observés dans les bronches d'asthmatiques [119], mais leur rôle dans la physiopathologie de l'asthme est encore inconnu.

En plus des molécules de défense libérées par les granules, le neutrophile est également à l'origine de la production de cytokines telles que l'IL-1 β , l'IL-6, l'IL-8, le TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α) et le TGF- β , qui peuvent agir sur la CML notamment [120, 121]. D'ailleurs, la production de TGF- β , cytokine profibrotique, est augmentée par les neutrophiles d'asthmatiques [122]. Les neutrophiles sécrètent aussi des protéases comme les métalloprotéinases 9 (MMP-9) et l'élastase qui vont dégrader la matrice extracellulaire [123]. L'élastase peut provoquer des effets antagonistes sur le muscle lisse. Pour des concentrations faibles (de 0,01 à 0,5 μ g/ml) elle induit la prolifération des CML [124], alors que pour des concentrations plus fortes (jusqu' à 3 μ g/ml) elle induit l'anoïkis (apoptose induite par le détachement des cellules) [125]. Dans le rôle pro-remodelant de l'élastase, on note aussi sa capacité à induire la production de TGF- β par les CML [126]. Dans un rôle plus protecteur, l'élastase est capable d'inhiber la synthèse d'IL-8 des CML [127] donc de limiter les effets de

prolifération et de migration de l'IL-8 sur les CML [128] et de limiter l'inflammation neutrophilique. Cette enzyme est aussi capable de « désamorcer » le récepteur PAR-2 (Protease Activated Receptor-2), présent à la surface des CML (qui sera décrit ultérieurement), en clivant sa séquence liée d'activation. Ainsi la tryptase des mastocytes n'a plus d'effet sur ce récepteur [129].

Parmi les enzymes observées dans les granules des neutrophiles, YKL-40, aussi appelé Chitinase-3-like protein 1 (CHI3L1) a été identifié [130]. Cette chitinase est impliquée dans le remodelage bronchique [131, 132], mais il est difficile d'affirmer que l'YKL-40 mesuré dans les différentes études soit d'origine neutrophilique, bien qu'il existe une corrélation entre le nombre de neutrophiles dans les expectorations d'asthmatique et le niveau d'YKL-40 ($r = 0.55$, $p < 0.001$) [133]. Une autre étude récente montre que l'augmentation d'YKL-40 dans le sérum d'enfant asthmatique sévère, résistant aux thérapies, est corrélé aux neutrophils circulants ($r = 0.63$, $p < 0.001$) [132].

I – A – 2 – c. Remodelage bronchique

Longtemps considéré comme un processus anormal de réparation de l'inflammation bronchique, le remodelage bronchique représente également un facteur de pérennisation de celle-ci. Il se caractérise par un ensemble de modifications anatomiques affectant, à des degrés divers, toutes les composantes de la paroi bronchique des voies aériennes proximales et distales, *i.e.* l'épithélium, la membrane basale, la matrice extra-cellulaire, les glandes séro-muqueuses, les vaisseaux et le muscle lisse bronchique [134]. Ces altérations structurales, observées quel que soit le stade de sévérité de l'asthme, sont également susceptibles d'apparaître précocement dans l'histoire naturelle de la maladie, comme en témoignent les données histologiques issues de biopsies bronchiques chez des enfants asthmatiques [135 , 136]. Elles contribuent à l'installation d'une obstruction bronchique fixée, moins réversible, et correspondent donc à une évolution défavorable de la maladie [1 , 137].

Epithelium bronchique

L'asthme se caractérise, classiquement, par une desquamation de l'épithélium bronchique et un renouvellement cellulaire plus important. L'importance de ces altérations épithéliales est corrélée à l'HRB [138].

Dans l'asthme sévère, en revanche, l'épithélium est hyperplasique, avec une augmentation du nombre de cellules caliciformes [139 , 140 , 141]. Parmi les mécanismes à l'origine de cette hyperplasie, le rôle de la leptine, adipokine impliquée dans les processus inflammatoires et de réparation tissulaire, a été évoqué [142]. En effet, une diminution de l'expression de la leptine et de son récepteur, a été mise en évidence *in vitro* et *ex vivo* dans l'épithélium des asthmatiques sévères. Elle est, en outre, corrélée négativement à certains aspects du remodelage bronchique, tels que l'épaisseur de la membrane basale [142]. D'autre part, l'implication de la lipoxine A₄ (LXA₄) a également été suggérée dans les altérations

épithéliales chez l'asthmatique sévère. En effet, sa concentration est diminuée dans le surnageant issu d'expectorations induites de patients asthmatiques sévères [143]. La LXA₄ est un médiateur lipidique dérivé de l'acide arachidonique, aux propriétés anti-inflammatoires qui pourraient résulter de sa fixation sur son récepteur spécifique, le FPRL-1 (Formyl peptide receptor-like 1), dont l'expression dans l'épithélium de l'asthmatique sévère reste à préciser.

L'épithélium, en tant que première barrière contre les pathogènes, subit de nombreuses altérations, conduisant à la production de médiateurs inflammatoires [144]. L'impact de cette inflammation sur le remodelage bronchique fait l'objet de nouvelles études, et permet d'étudier les interactions épithélium-muscle. Dernièrement, il a été montré que la production d'IL-8 de l'épithélium bronchique, induite par YKL-40, une chitinase-like produite par l'épithélium en condition inflammatoire, stimule la prolifération et la migration des CML bronchiques [128]. D'ailleurs, YKL-40 elle-même induit une prolifération et une migration des CML bronchiques d'asthmatiques [131]. Ainsi l'épithélium participe aussi au remodelage musculaire lisse bronchique qui sera décrit par la suite.

Membrane basale et matrice extracellulaire

Une fibrose sous-épithéliale intéressant la lamina reticularis est observée dans l'asthme, et est à l'origine d'un pseudo-épaississement de la membrane basale [134]. Elle résulte de la combinaison de deux mécanismes. D'une part, le dépôt de protéines de la matrice extra-cellulaire (collagène I, III, V, fibronectine, tenascine, protéoglycanes) par les fibroblastes, myofibroblastes et CML [145 , 146]. D'autre part, il existe un déséquilibre entre l'expression des métalloprotéases qui dégradent ces protéines et celle de leurs inhibiteurs endogènes, les TIMP (Tissue Inhibitor of MetalloProteinases) [147 , 148].

Glandes séro-muqueuses

Une hypertrophie des glandes séro-muqueuses est retrouvée dans l'asthme et conduit à une hypersécrétion de mucus, qui majore l'obstruction bronchique et l'HRB [149]. Les mécanismes responsables de cette hypertrophie sont imparfaitement connus à l'heure actuelle. Toutefois, l'implication de gènes responsables de la production de mucus comme MUC2 et MUC5AC a été démontrée [150 , 151]. Leur expression peut être induite par différentes cytokines Th2, comme l'IL-4, l'IL-5, ou l'IL-13 [149 , 151 , 152 , 153]. L'IL-1 β [149], le TNF- α [154] ou l'IL-17A, via l'induction de l'IL-6 [155], semblent être également mis en jeu dans l'activation de ces gènes.

Angiogenèse

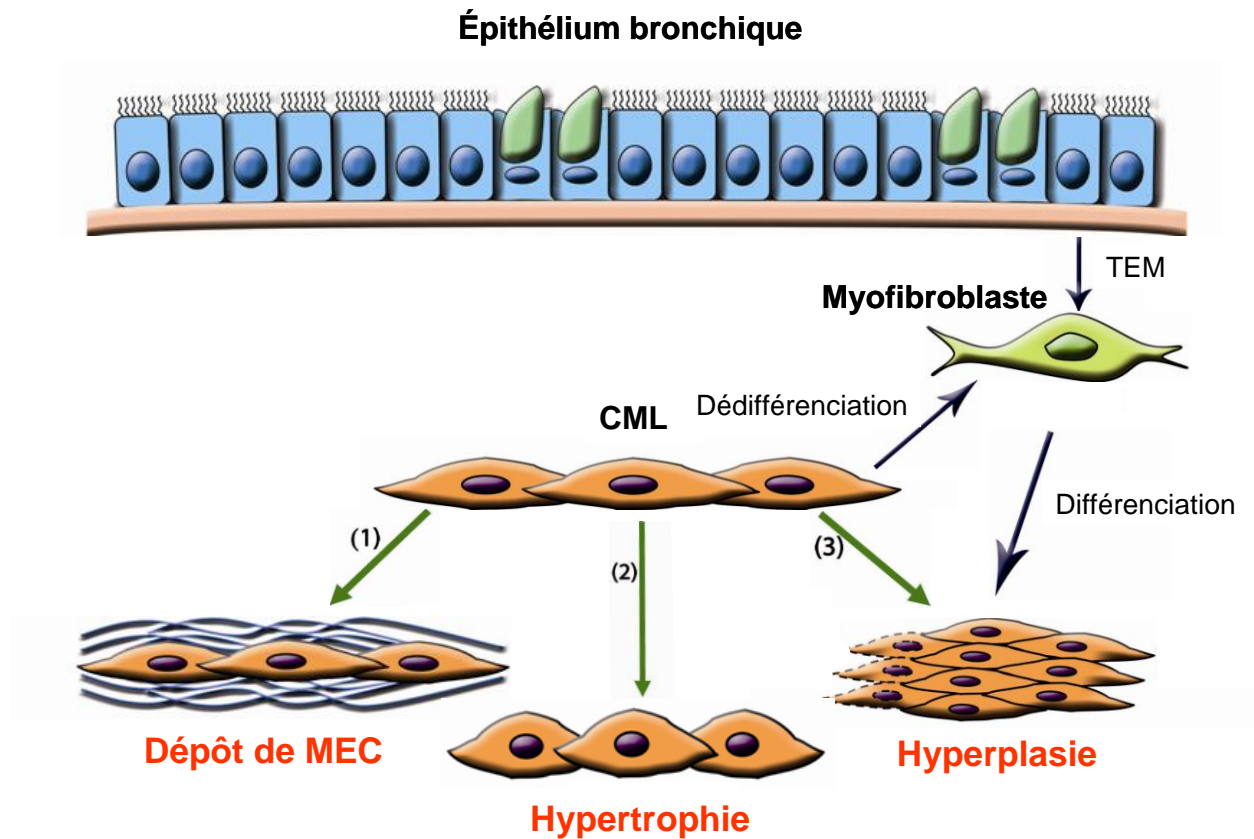
Le nombre des vaisseaux sanguins bronchiques est augmenté dans l'asthme, chez l'enfant et l'adulte, et est corrélé à la sévérité de la maladie [136 , 156 , 157]. Bien que les mécanismes responsables de cette angiogenèse soient encore mal connus [158], plusieurs travaux suggèrent l'implication du VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). En effet, l'expression de ce facteur de croissance de l'endothélium est augmentée dans les biopsies bronchiques d'asthmatiques et est colocalisée avec les marqueurs des éosinophiles, des mastocytes et des lymphocytes Th2, suggérant un rôle possible de l'inflammation dans l'angiogenèse [159 , 160]. En effet, dans un modèle de souris asthmatique, l'inhibition du VEGF conduit à une diminution de l'inflammation bronchique [161]. A l'inverse, dans un modèle de souris transgénique surexprimant le VEGF au niveau épithélial, on observe une augmentation de l'angiogenèse et de l'inflammation bronchique [162]. Très récemment, un modèle de souris sensibilisée par HDM (House Dust Mite), montre que le recrutement des cellules pro-génitrices endothéliales dans le poumon, induisant une néo-vascularisation, est dépendant de l'IL-25, démontrant un rôle direct de l'IL-25 au cours de l'angiogenèse *in vivo*

[163]. Une autre étude utilisant aussi le modèle murin sensibilisé par HDM, montre que la sensibilisation à l'allergène induit la production de HIF-1 α (Hypoxia Inducible Factor-1alpha) par les macrophages alvéolaires. Le blocage de HIF-1 α diminue le niveau de VEGF-A et CXCL1 dans les poumons et permet de diminuer le recrutement des cellules pro-génitrices endothéliales ainsi que l'angiogénèse [164].

Muscle lisse bronchique

L'augmentation de la masse du muscle lisse bronchique représente une composante essentielle du remodelage bronchique dans l'asthme [165]. Elle est en effet corrélée à une dégradation non réversible de la fonction ventilatoire chez l'asthmatique [1, 137]. Cette augmentation de la masse musculaire lisse résulte, non seulement, d'un dépôt accru de protéines de la matrice extra-cellulaire, mais aussi, d'une hypertrophie et d'une hyperplasie des CML (Figure 9) [166]. Les mécanismes à l'origine de ce remodelage musculaire lisse sont développés dans le chapitre I.B.

Figure 9. Principales caractéristiques du remodelage musculaire lisse dans l'asthme.



Légende : L'augmentation de la masse musculaire lisse dans l'asthme résulte d'un dépôt accru de protéines de la matrice extra-cellulaire, d'une hypertrophie et d'une hyperplasie des cellules musculaires lisses. L'hyperplasie peut être due à une augmentation de la prolifération, une diminution de l'apoptose ou le recrutement de cellules mésenchymateuses.

CML : cellule musculaire lisse ; MEC : matrice extra-cellulaire ; TEM : transition épithélio-mésenchymateuse. (Adapté de Bara I. et al. ; Eur Respir J 2010 [166])

I – B – Le rôle pivot de la CML dans la physiopathologie de l’asthme

Cette partie a fait l’objet d’une revue didactique publié dans Journal of Allergy.

Article n°1:

The pivotal role of airway smooth muscle in asthma pathophysiology

Ozier A, Allard B, Bara I, Girodet PO, Trian T, Marthan R, Berger P.

J Allergy (Cairo). 2011;2011:742710. Epub 2011 Dec 11.

Review Article

The Pivotal Role of Airway Smooth Muscle in Asthma Pathophysiology

Annaïg Ozier,^{1,2,3} Benoit Allard,^{1,2} Imane Bara,^{1,2} Pierre-Olivier Girodet,^{1,2,3} Thomas Trian,^{1,2} Roger Marthan,^{1,2,3} and Patrick Berger^{1,2,3}

¹ Univ. Bordeaux, Centre de Recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux, F-33000 Bordeaux, France

² INSERM U1045, F-33000 Bordeaux, France

³ CHU de Bordeaux, Service D'Exploration Fonctionnelle Respiratoire, CIC-P 0005, F-33000 Bordeaux, France

Correspondence should be addressed to Patrick Berger, patrick.berger@u-bordeaux2.fr

Received 13 July 2011; Accepted 30 August 2011

Academic Editor: Brian Oliver

Copyright © 2011 Annaïg Ozier et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Asthma is characterized by the association of airway hyperresponsiveness (AHR), inflammation, and remodelling. The aim of the present article is to review the pivotal role of airway smooth muscle (ASM) in the pathophysiology of asthma. ASM is the main effector of AHR. The mechanisms of AHR in asthma may involve a larger release of contractile mediators and/or a lower release of relaxant mediators, an improved ASM cell excitation/contraction coupling, and/or an alteration in the contraction/load coupling. Beyond its contractile function, ASM is also involved in bronchial inflammation and remodelling. Whereas ASM is a target of the inflammatory process, it can also display proinflammatory and immunomodulatory functions, through its synthetic properties and the expression of a wide range of cell surface molecules. ASM remodelling represents a key feature of asthmatic bronchial remodelling. ASM also plays a role in promoting complementary airway structural alterations, in particular by its synthetic function.

1. Introduction

The pathophysiology of asthma is characterized by the association of airway hyperresponsiveness (AHR), inflammation, and remodelling [1–3]. AHR is defined by an increased airway narrowing to a wide range of stimuli and is responsible for recurrent episodes of wheezing and breathlessness. Airway smooth muscle (ASM) is considered as the main cell type involved in AHR [4, 5]. Bronchial inflammation in asthma involves the recruitment of various inflammatory cells including eosinophils, mast cells and T lymphocytes [1]. However, the microlocalization of these cell types is different within the asthmatic ASM layer [6], suggesting complex interactions between inflammatory cells and ASM cells. Bronchial remodelling is described as an increased thickening of the bronchial wall due to various structural alterations including epithelial changes [7], subepithelial membrane thickening, enhanced extracellular matrix (ECM) deposition [8], mucous gland and goblet cell hypertrophy and hyperplasia [9], neoangiogenesis [10], and increase in

ASM mass [11, 12]. This latter appears to be a key feature of bronchial remodelling since increased ASM mass is associated with a decrease in lung function in asthma [13–15]. The aim of the present article is thus to review the pivotal role of ASM in the pathophysiology of asthma.

2. Role of ASM in Airway Hyperresponsiveness

AHR is usually described as either nonspecific or specific AHR (Table 1). Nonspecific AHR is a common feature of asthma, although it is also found in some patients suffering from chronic obstructive pulmonary disease or allergic rhinitis [16]. Stimuli inducing nonspecific AHR can be direct or indirect (Table 1). Direct mediators stimulate ASM cell membrane receptors. For instance, methacholine activates muscarinic M3 receptor and induces ASM contraction [17]. Conversely, indirect mediators first stimulate one or more intermediary cells, leading to the release of contractile agonists, which, in turns, induce ASM contraction [18]. All of these indirect challenges are associated with the release

TABLE 1: Stimuli used to assess airway hyperresponsiveness (AHR) *in vivo*.

AHR	Mechanisms	Types	Stimuli
Nonspecific	Direct	Pharmacological	Methacholine [22]
			Histamine [23]
Nonspecific	Indirect	Physical	Exercise [24]
			Cold air, dry air [25]
			Eucapnic hyperventilation [26]
			Hypo osmolar solution [27]
Nonspecific	Indirect	Chemical	Adenosine monophosphate [28]
			Mannitol [27]
Specific	Indirect	Allergen	Pollens, House dust mites [29]

of mast cell mediators, such as prostaglandins, PGD₂ and PGF₂ α , or histamine, which, respectively, activate ASM cell membrane receptors TP, FP, and H₁ [19]. For instance, acute and intense exercise induces airway dehydration, increasing osmolarity of the airway surface liquid [20]. Cell volume shrinkage and restoration release both mast cell mediators and acetylcholine from nerves [20]. On the other hand, specific AHR is limited to allergic asthmatics. In such case, the stimulus is an allergen against which the patient is specifically sensitized. The mechanism of ASM contraction also involves the release of mast cell mediators. Specific AHR measurement is restricted to clinical trials or detection of occupational diseases. Indeed, allergen-specific stimulation can enhance nonspecific AHR [21] and induce a late phase response [19].

The mechanisms of AHR in asthma may involve (i) a larger release of contractile mediators, (ii) a lower release of relaxant mediators, (iii) an improved ASM cell excitation/contraction coupling, and/or (iv) an alteration in the contraction/load coupling.

2.1. Larger Release of Contractile Mediators. The contraction of ASM can be induced by a variety of extracellular messengers, which act through interaction with specific receptors at the site of the plasma membrane of ASM (Table 2). These contractile agonists, either inflammatory mediators or neurotransmitters, are released at high concentrations in asthmatic bronchi, especially regarding mast cell mediators following indirect challenges [19]. For instance, mast cells release tryptase, which increases ASM cells cytosolic calcium concentration [30], allowing them to contract after activation of the protease activated receptor (PAR) type 2, expressed on their membrane [31]. Mast cells, but also eosinophils, produce contractile prostaglandins such as PGF₂ α , PGD₂, and thromboxane TXA₂. The concentration of these prostaglandins, and also that of histamine, is

TABLE 2: Contractile and relaxant mediators for ASM.

Types of mediators	Actions	Stimuli
Inflammatory	Contraction	Histamine [23]
		Tryptase [42]
		Prostanoids (PGF ₂ α , PGD ₂ , TXA ₂) [43]
		Cysteinyl leukotrienes (LTC ₄ , LTD ₄ , LTE ₄) [22]
Neurotransmitters	Contraction	Endothelin [44]
		Acetylcholine [45]
		Neurokinine A [46]
		Substance P [46]
Inflammatory	Relaxation	Calcitonin Gene Related Peptide [47]
		Prostanoids (PGE ₂ , PGI ₂) [48]
Neurotransmitters	Relaxation	Adrenaline [49]
		Noradrenaline [50]
		Vasoactive Intestinal Peptide [46]

increased in asthma [32]. Similarly, inflammatory cells also produce both cysteinyl leukotrienes (LTC₄, LTD₄, LTE₄), which are also very potent direct contractile agonists of ASM [33], and LTB₄, which acts indirectly through the release of TXA₂ [34]. Such cysteinyl leukotrienes are also increased in asthma [35], as well as endothelin [36], another direct contractile agonist of ASM [37], produced by epithelial cells or endothelial cells [38]. The release of contractile neurotransmitters, acetylcholine or tachykinins, is also known to be higher in asthma [39, 40]. It is noteworthy that the loss of epithelial barrier integrity commonly associated with asthma may increase exposure of ASM to inhaled contractile agonists [41].

2.2. Lower Release of Relaxant Mediators. AHR may also be related to a lower release of relaxant agonists either neurotransmitters or inflammatory mediators (Table 2). Physiologically, the adrenergic innervation is sparse in the ASM [51]. Moreover, a decreased number of β ₂-adrenergic receptor sometimes associated with its desensitization has been suggested in asthma following chronic medication with short-acting β ₂-agonists [52]. A lower release of adrenaline has also been demonstrated during asthma attacks [53]. The second important relaxing neurotransmitter is the vasoactive intestinal peptide (VIP), which is colocalized with acetylcholine [54]. However, the expression of VIP in the asthmatic ASM is not decreased but surprisingly increased [55]. By contrast, the production of PGE₂, which is known to relax ASM, is significantly lower in asthmatic than in nonasthmatic ASM cells [56]. Other cellular sources of PGE₂ and other ASM relaxant, such as NO, may also be implicated.

2.3. Improved ASM Cell Excitation/Contraction Coupling. Cytokines, such as IL-5 or IL-13, that are both increased in asthma, do not contract ASM *per se*. In fact, IL-5 induces

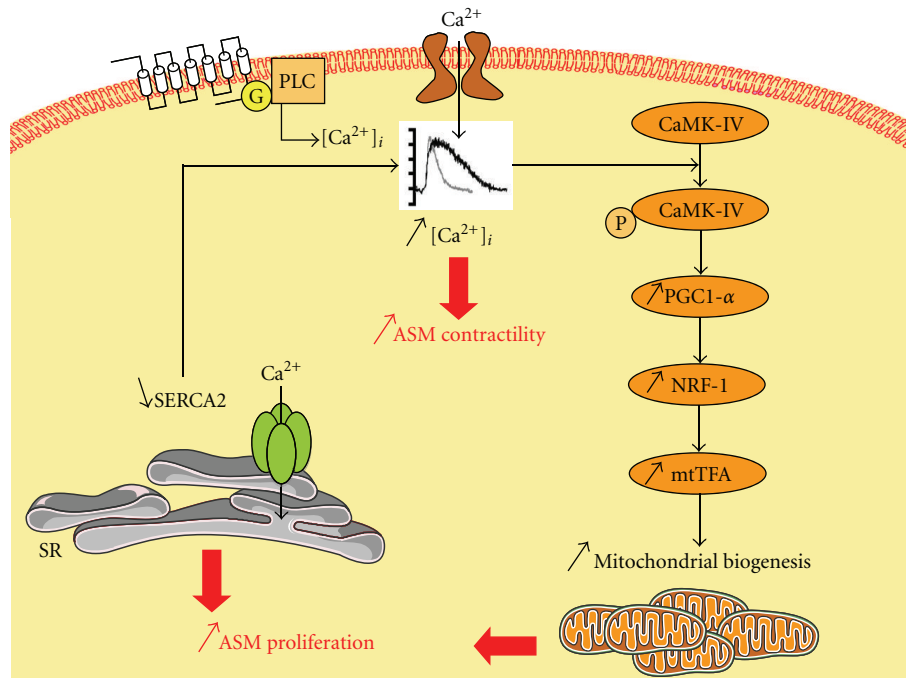


FIGURE 1: Impaired ASM cell calcium homeostasis leading to enhanced proliferation in asthma. In severe asthmatic ASM cells, an altered calcium homeostasis related to an increased influx leads to phosphorylation and activation of CaMK-IV, that, in turns, successively activates PGC-1 α , NRF-1, and mtTFA. This transduction pathway results in an increase of mitochondrial biogenesis leading to enhanced ASM proliferation [61]. In nonsevere asthmatic ASM cells, an altered expression and function of SERCA2 may account for the altered calcium homeostasis, which leads to enhanced ASM proliferation [62]. Whatever the mechanism, such altered calcium homeostasis enhances cell contractility. ASM: airway smooth muscle; CaMK-IV: calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV; G: G protein; mtTFA: mitochondrial transcription factor A; NRF: nuclear respiratory factor; PGC: peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator; PLC: phospholipase C; SERCA: sarcoendoplasmic calcium pump; SR: sarcoplasmic reticulum.

in vitro AHR to acetylcholine in isolated rabbit ASM tissue and IL-13 reduces responsiveness to adrenaline in human ASM cells [57, 58]. Moreover, mast cell-derived tryptase induces AHR to histamine *in vitro* using human bronchi from actively sensitized [59] or nonsensitized patients [60] possibly *via* its enzymatic activity. However, such AHR occurs after an initial calcium response and, thus, in the absence of any spontaneous contraction. Indeed, AHR may also depend on excitation/contraction coupling, which associates two subsequent steps within the ASM cell, that is, (i) the calcium response induced by extracellular messengers and (ii) the calcium sensitivity of the contractile apparatus.

On the one hand, following extracellular stimulation, ASM cytosolic calcium homeostasis is dependant on various components. For instance, the spontaneous return to baseline of the cytosolic calcium concentration is dramatically delayed in asthmatic ASM cells [61]. Such a delay can be related with an abnormal calcium entry [61] and/or with a downregulated expression and function of type 2 of the sarcoendoplasmic calcium pump, that is, SERCA2 [62] (Figure 1). SERCA2 protein expression could be experimentally decreased by IL-13 or TNF- α (TNFSF2) [63]. Alternatively, the proinflammatory cytokine, IL-1 β , can increase CD38 (ADP-ribosyl cyclase) expression. Then, CD38 increases cyclic ADP-ribose (cADPR) production, which, in turns, activates ryanodin receptor (RyR), leading to an increase in cytosolic calcium concentration [64–66].

In addition, calcium compartmentalization could be another determinant of airway responsiveness. In asthmatic ASM, there could be a greater proportion of intracellular calcium within the deep cytosolic space as compared to the superficial subplasmalemmal space [67], leading to AHR. However, such hypothesis needs to be confirmed.

On the other hand, the calcium sensitivity of the contractile apparatus can be increased, leading to a higher contractile response after a similar ASM intracellular calcium rise [68]. Two different mechanisms have been described according to the dependency or the independency from the myosin light chain kinase/myosin light chain phosphatase (MLCK/MLCP) ratio (Table 3). Regarding MLCK/MLCP-dependent AHR, the level of MLCK is increased in asthmatic ASM [69, 70]. The transcription factor CCAAT/enhancer binding protein- α (C/EBP- α) expression is decreased within the asthmatic ASM [71]. Since the promoter that regulates the expression of MLCK contains several C/EBP- α binding sites, such a deficit in C/EBP- α has been proposed to account for the increased expression of MLCK [72]. Nevertheless, such increased expression of MLCK in asthmatic ASM needs to be confirmed since controversial findings have also been reported [73, 74]. Regarding MLCK/MLCP-independent AHR, calcium-independent PKC ϵ inhibits calponin, an actin thin filament-associated protein [75] that decreases calcium sensitivity [76]. It also activates mitogen-activated protein kinase (MAPK), which inhibits caldesmon, another actin

TABLE 3: Excitation/contraction coupling in ASM cells.

MLCK/MLCP balance	Extracellular factors	Intracellular factors	Actions	Consequences	References
Dependent	β -adrenergic agonist	CaMKII	I: MLCK	R	[84]
		PKA	I: MLCK	R	[85]
		PDE4D increase	I: PKA	C	[86]
	TNF- α (TNFSF2), IL-13	PKG	A: MLCP	R	[87]
		Rho-kinase	I: MLCP	C	[87]
		Arachidonic acid	A: Rho kinase	C	[88, 89]
		Arachidonic acid	I: MLCP	C	[88, 90]
		CPI-17	I: MLCP	C	[87]
		C/EBP- α decrease	I: MLCK	C	[72]
Independent	Derp1, LPS TNF- α (TNFSF2), IL-13	Caldesmon	I: Myosin ATPase activity	R	[91]
		Calponin	I: Myosin ATPase activity	R	[92]
		PKC ϵ	I: Caldesmon	C	[75]
		PKC ϵ	I: Calponin	C	[75]
		MAPK	I: Caldesmon	C	[75, 93, 94]
		Rho-kinase	I: Calponin	C	[95]
		CaMKII	I: Calponin	C	[95]
		HSP phosphorylated	I: Contraction	R	[96, 97]

A: active; C: contracting; CaMKII: calcium/calmodulin-dependent protein kinase; CPI-17: 17-kDa PKC-potentiated inhibitory protein of PP1; C/EBP α : CCAAT/enhancer binding protein α ; Derp1: house dust mite allergen; HSP: heat shock protein; I: inhibit; IL-13: interleukin-13; LPS: lipopolysaccharide; MAPK: mitogen-activated protein kinase; MLCK: myosin light chain kinase; MLCP: myosin light chain phosphatase; PDE4D: phosphodiesterase 4D, cAMP-specific; PKA: cAMP-dependent protein kinase A; PKC ϵ : protein kinase C ϵ ; PKG: cGMP-dependent protein kinase G; R: relaxing; PP1: protein phosphatase 1; TNF- α : tumor necrosis factor α .

thin filament-associated protein [75] that also decreases calcium sensitivity [76]. Alternatively, RhoA/Rho-kinase signalling, which is increased in experimental asthma, inactivates MLCP leading to MLCK/MLCP-dependent AHR [77], and also inhibits calponin leading to MLCK/MLCP-independent AHR. Such RhoA signalling can be reproduced experimentally, using either the proinflammatory cytokine TNF- α (TNFSF2), which activates RhoA [78], or IL-13, which increases its expression in murine ASM [79].

Finally, the alteration in the dynamic properties of ASM in asthma is still a matter of current debate. The maximal velocity of shortening in ASM from sensitized animals is significantly greater than those in nonsensitized [80] and may be a consequence of an increase in the activity of MLCK [81] but is still controversial (see above). With respect to force generation, although isometric force generated *in vitro* is directly related to ASM mass in human bronchial ring preparations [82], force generation from asthmatic ASM was not found consistently increased [83].

2.4. Alteration in Contraction/Load Coupling. Like any muscle, ASM may overcome loads that normally moderate ASM shortening [98]. Two main categories of mechanical loads thus apply to ASM: a preload, which is directly related to lung elastic recoil and lung volume, and an afterload, which is determined by the shear modulus of the parenchyma and the coupling of the lung to the airways [98]. Some of these loads reside at the airway cellular/tissular level. Any alteration in such loads against which the ASM contracts and/or in the application of these loads to ASM will result in an alteration in shortening and, hence, airway narrowing.

In asthma, several mechanisms may account for an alteration in the contraction/load coupling [83, 98] such as an increase in lung elastic recoil pressure and a lung expansion that increase the external load that opposes ASM shortening. Indeed, loss of lung elastic recoil related to hyperinflation has been demonstrated in acute asthma [99] and chronic persistent asthma even without emphysema [100]. Moreover, a coupling between lung parenchyma and airways occurs through the attachments of elastic fibers to the airway wall [98]. In healthy individuals, periodic deeper inspirations (DIs) dilate the airways because of an excessive relative airway hysteresis as compared to parenchymal one [101]. In contrast, loss of the beneficial effect of DI is sometimes considered as a hallmark of asthma [102, 103]. Why DI induces bronchoconstriction in some asthmatic patients remains a matter of debate. Leading hypotheses put forward include neurohormonal mechanisms such as increase in cholinergic tone [104] or mechanical mechanisms such as calcium-dependent myogenic response of ASM [105] or loss of interdependence between lung parenchyma and airways [106]. Such uncoupling of the forces of interdependence may also be the result of airway inflammation and remodelling, especially thickening and/or oedema of the adventitia [107–109]. Moreover, stiffness of the airway wall may reduce the ability of tidal breathing and DI to stretch ASM, leading to latch bridges between actin/myosin and to a vicious positive feedback [110, 111]. Finally, altered organization and degradation of ECM proteins might also be less effective to moderate ASM shortening [83, 112, 113].

On the other hand, thickening of the airway wall and the enhanced amount of ECM also increase airway stiffness and

TABLE 4: Mediators secreted and immunomodulatory proteins expressed by human ASM cells.

Factors	References
<i>Cell adhesion/costimulatory molecules, receptors</i>	
CD11a	[117]
CD40 (TNFRSF5), CD40L (TNFSF5), CD44	[118]
CD80, CD86	[117]
OX40L (TNFSF4)	[119]
Adhesion molecules: ICAM-1, VCAM-1	[118]
Major histocompatibility complex (MHC) II	[120]
Toll-like receptors: TLR2, 3, 4	[121]
Chemokine receptors: CCR3, 7	[122]
Chemokine receptors: CXCR1, 3, 4	[122]
Receptors for IL-4, 6, 12, 13, 17, 22 and IFN- γ	[116, 123]
<i>Chemokines, cytokines, and growth factors</i>	
CCL2, 5, 7, 8, 11, 17, 19	[124–128]
CXCL8, 10	[129, 130]
CX ₃ CL1	[55]
IL-2, 5, 6, 11, 12	[57, 131]
Interferon- (IFN-) γ	[57]
Connective tissue growth factor (CTGF)	[132]
Granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF)	[133]
Stem cell factor (SCF)	[134]
Transforming growth factor- (TGF-) β 1	[135]
Vascular endothelial growth factor (VEGF)	[136]
<i>ECM proteins</i>	
Chondroitin sulfate	[137]
Collagens I, III, IV, V	[137]
Decorin, elastin, fibronectin, laminin, perlecan	[137]
Thrombospondin	[137]
Tissue inhibitor of MMPs- (TIMPs-) 1, 2	[138]
<i>Enzymes</i>	
Matrix-metalloproteinases- (MMPs-) 9, 12	[139]

decrease airway compliance [114] that might enable the airways to resist to dynamic compression. Moreover, deposition of connective tissue also acts as mechanical impedance to contraction [113]. Nevertheless, these theoretical advantages of airway remodelling are largely overwhelmed by their negative effects [83].

3. Role of ASM in Bronchial Inflammation

While early studies regarding ASM function in asthma focussed on its contractile properties, a growing body of evidence now consistently demonstrates that ASM is no longer a sole target of the inflammatory process. Indeed, ASM cell also displays proinflammatory and immunomodulatory functions [115, 116], through its synthetic function and its expression of a wide range of cell surface molecules, integrins, costimulatory molecules, and Toll-like receptors (Table 4). As a consequence, ASM can play an active role, through an autocrine and/or a paracrine manner, in the asthmatic inflammatory process. The molecular and cellular mechanisms modulating ASM cell/inflammatory cell

function will be reviewed below, with special attention to those implicating mast cells and T lymphocytes, which are known to infiltrate the asthmatic ASM layer [6].

3.1. ASM/Mast Cell Interaction. There is evidence that the asthmatic ASM layer is infiltrated by an increased number of mast cells [6, 55, 130, 140–147]. Some mast cells are already present in nonasthmatic ASM including smokers [148–152]. However, this mast-cell microlocalization within the asthmatic ASM, termed mast cell myositis [153], appears to be a specific feature of asthma, being absent in patients suffering from eosinophilic bronchitis and healthy subjects [140, 145]. Interestingly, the mast cell myositis is observed in various asthma phenotypes, including eosinophilic and noneosinophilic asthma [154], and also atopic and non atopic asthma, even if the number of mast cells is significantly higher in the ASM of atopic asthmatics [142]. Moreover, mast cell myositis is unchanged whether asthma is treated or not [145, 146], or regardless of asthma severity [143, 145–147].

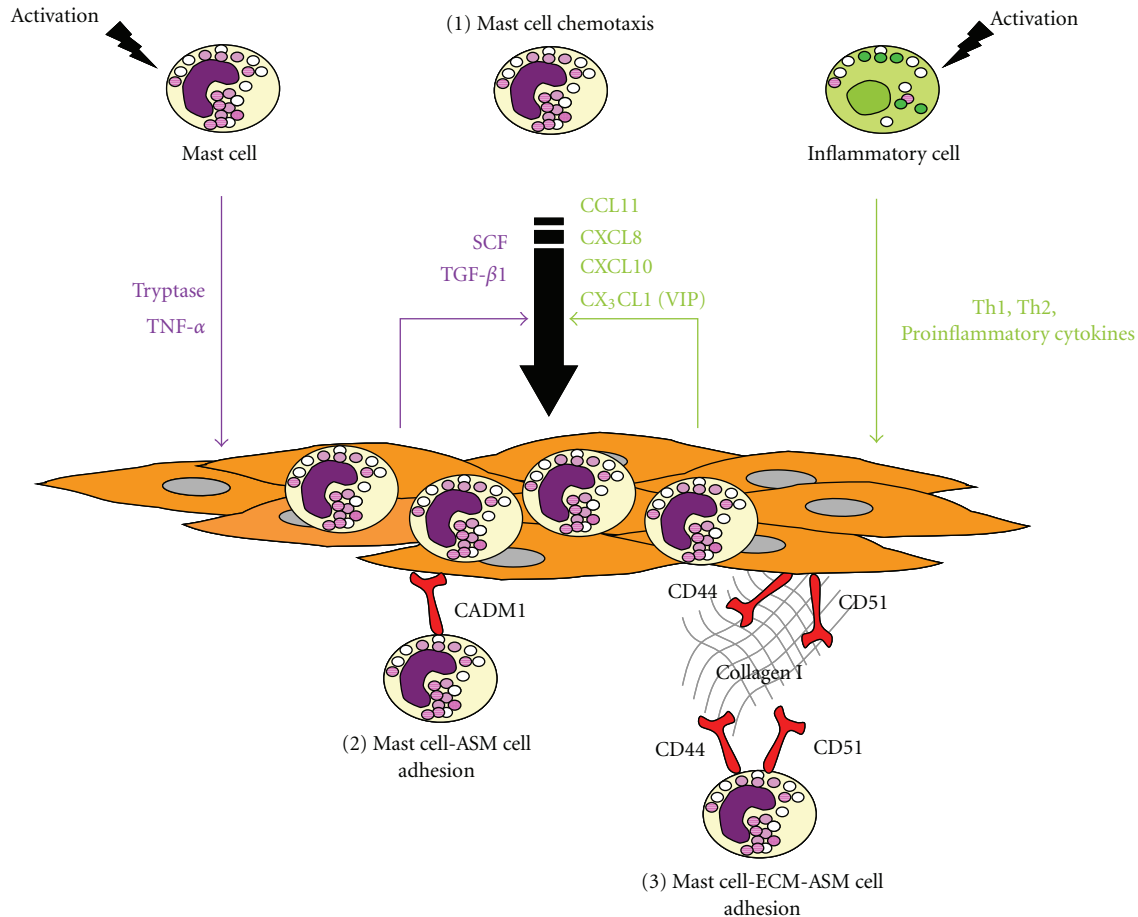


FIGURE 2: Mechanisms underlying mast cell myositis in asthma. In asthma, the mechanisms leading to an infiltration of airway smooth muscle (ASM) layer by mast cells, termed mast cell myositis, involve (1) mast cell chemotaxis towards the ASM bundle, (2) direct mast cell-ASM cell adhesion, and (3) mast cell-extracellular matrix- (ECM-) ASM cell adherence. Upon mast cell activation, mast cells release mediators which activate ASM cells, such as tryptase and TNF- α (TNFSF2). As a consequence, ASM cells produce and secrete chemotactic factors for mast cells, leading to an autoactivation loop. Under stimulation by Th1, Th2, and/or proinflammatory cytokines, produced by various inflammatory cells, ASM cells also secrete a wide range of mast cell chemotactic factors.

The mechanism of such a myositis has been firstly related to the production of mast cell chemotactic factors by the ASM itself, through an autoactivation loop [144] (Figure 2). Indeed, upon activation, mast cells release tryptase and proinflammatory cytokines, such as TNF- α (TNFSF2), which stimulate the production of TGF- β ₁ and, to a lesser extent, SCF by ASM cells, which in turns, induce mast cell chemotaxis [144]. Moreover, ASM can promote mast cell chemotaxis through the secretion of a wide array of chemoattractants, upon stimulation by Th1 [130], Th2 [130, 155] or proinflammatory cytokines [55, 144]. For instance, ASM also produces functionally active CXCL10 [130], CXCL8 [155], CCL11 [155], and CX₃CL1 [55], even if, for CX₃CL1, the additional presence of VIP is necessary [55]. Taken together, these findings support the view that mast cell migration depends on various mediators secreted by ASM and is closely related to ASM inflammatory microenvironment.

Once present within the ASM bundle, mast cells can adhere to ASM. This adhesion has been initially ascribed to a cell-cell interaction involving an Ig superfamily member, that is, cell adhesion molecule 1 (CADM1), previously known

as tumor suppressor in lung cancer 1 (TLSC-1) [156, 157] (Figure 2). However, blocking CADM1 leads to only a partial reduction in the adhesion of mast cells to ASM, suggesting additional mechanisms are present [156]. Indeed, mast cell-ASM adherence also involves cell-ECM-cell interaction through type I collagen, CD44, and CD51 [2] (Figure 2). This adhesion is improved under inflammatory conditions or using asthmatic ASM cells [2]. These *in vitro* findings are in agreement with ultrastructural analysis of asthmatic ASM using electron microscopy, demonstrating the absence of direct cell-cell contact between ASM and mast cells [6].

The majority of mast cells infiltrating the asthmatic ASM layer are typically of the MC_{TC} phenotype, containing both tryptase and chymase [140, 158, 159]. Interestingly, these mast cells infiltrate ASM in both large and small airways, and exhibit marked features of chronic ongoing activation [142, 143]. Such findings were also confirmed by ultrastructural analysis of ASM using electron microscopy [6]. However, little is known about the mechanisms by which mast cell activation may occur within the ASM layer [160]. Mast cell degranulation may result from IgE-dependent

activation, especially in atopic patients [142]. However, IgE-independent mechanisms have also been evoked, following mast cell-ASM interaction through the complement C3a or SCF [42, 157, 161, 162], for instance, or following bacterial or viral infection through Toll-like receptors [160].

Taking into account the following characteristics: (i) microlocalization of mast cells within the ASM layer, (ii) mast cell adherence to the ASM, and (iii) mast cell activation within the ASM, it is tempting to consider that a close functional relationship may exist between these two cell types.

On the one hand, mast cells alter functional and phenotypic properties of ASM cells. Indeed, mast cell-derived mediators contribute to AHR and ASM remodelling [12]. For instance, the major mast cell product, tryptase, induces both ASM calcium response [30] and AHR to histamine *in vitro* [60] or *in vivo* [163]. Tryptase also increases ASM cell-TGF- β 1 secretion, which, in turns, promotes ASM cells differentiation towards a contractile phenotype, characterized by an increase expression of α -actin and enhanced contractility [42]. Interestingly, the number of mast cells within the ASM layer is positively correlated with the degree of AHR [140, 145], and with the intensity of α -smooth muscle actin [42].

Mast cell myositis may also promote ASM remodelling. However, although several mast cell products such as tryptase are known to individually stimulate both DNA synthesis and ASM proliferation [164], coculturing ASM and mast cells does not increase proliferation [161]. Similarly, ASM survival is not enhanced by mast cell interaction [161]. Both mast and ASM cell-derived CCL19 mediate ASM migration through ASM CCR7 activation [128]. By contrast, CCL11/CCR3-mediated ASM cell migration was inhibited by mast cells [165]. No correlation was found between the number of mast cells in the ASM and ASM mass, supporting the modest role of mast cells in ASM remodelling [142].

On the other hand, ASM cells alter functional and phenotypic properties of mast cells. Indeed, ASM cells can promote mast cell survival, hence providing a favorable microenvironment for mast cells [157]. They also enhance their proliferation, through a mechanism involving a cooperative interaction between ASM membrane-bound SCF, soluble IL-6, and mast cell-expressed CADM1 [157]. ASM cells-derived ECM proteins may also promote mast cells differentiation towards a fibroblastoid phenotype, characterized by the expression of fibroblast markers and fibroblast-like morphology. This feature seems to be specific of mast cells within the ASM layer, since fibroblast markers are not expressed in submucosal mast cells [147].

3.2. ASM/T Cell Interaction. Up to now, only few studies have documented T cell infiltration within the ASM layer in asthma. CD4⁺ T cell microlocalization within ASM layer was first reported in an elegant experimental rat asthma model [166]. This finding was further confirmed in human asthmatics [6, 15] and is related to asthma severity [15]. Moreover, this feature appears to be specific of asthma, since T cells were not found in the ASM layer of control subjects, but within and beneath the epithelium [15]. As compared

to mast cell ASM infiltration, there is a relative paucity of T cells within the ASM layer [6, 140]. However, ASM cells are able to produce appropriate chemotactic factors for T cells, such as CCL5 [125]. In this respect, a possible role for mast cell chymase has been suggested since this protease is known to inhibit T cell adhesion to nonasthmatic ASM cells *in vitro* [167]. Nonetheless, close contact were pointed out between ASM cells and T cells in asthma *ex vivo* [6, 15], hence suggesting cell-cell adherence between these two cell types.

Lazaar and coworkers originally demonstrated that activated T cells can adhere *in vitro* to resting ASM cells from nonasthmatic patients and that such an adhesion was enhanced when ASM cells were primed with proinflammatory cytokines such as TNF- α (TNFSF2) [118]. These findings were independently further confirmed [117]. This adhesion involves CD44, intercellular cell adhesion molecule 1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) expressed by ASM cells, and CD44, lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1) and very late antigen 4 (VLA-4) expressed by T cells [118]. More recently, nonasthmatic ASM cells, pulsed to the superantigen staphylococcal enterotoxin A (SEA), have been shown to adhere to T cells by presenting the SEA *via* their MHC class II [168]. Although ASM cells express MHC class II, constitutively as well as under stimulation [117, 120], they are not classically considered as an antigen-presenting cell. Consequently, these findings support an emerging role of ASM cell as an immunomodulatory cell. However, except for VCAM-1, which forms clusters in the asthmatic ASM *ex vivo* suggesting VCAM-1 mediated intercellular signalling, the role of the above molecules in adherence between T cell and ASM cell from asthmatic patients has not yet been considered. Two other ASM cell-surface molecules, CD40 (TNFRSF5) [117, 169–171] and OX40 ligand (TNFSF4) [119, 171, 172], both expressed in asthmatic and nonasthmatic ASM cells, may also play a role in promoting ASM cell-T cell adherence. These costimulatory cell-surface molecules, members of the TNF superfamily, respectively, bind to CD40L (TNFSF5) and OX40 (TNFRSF4) on activated T cells [173, 174]. However, their role in the adherence of T cells to asthmatic ASM remains to be investigated.

Close interaction between T cells and ASM cells may lead to stimulatory cross-talk between these two cell types, but little is known about the functional consequences of such an interaction. On the one hand, T cells may alter functional properties of ASM cells. In this connection, T cells alter ASM contractile phenotype, enhancing ASM contractility to acetylcholine and reducing its relaxation to isoproterenol in isolated rabbit ASM tissue [117]. T cells may also drive ASM remodelling, in particular ASM hyperplasia [15, 118, 166]. Indeed, in an experimental rat asthma model, adoptively transferred CD4⁺ T cells from OVA-sensitized rats increases ASM mass, which is both associated with an increased ASM proliferation and decreased apoptosis *ex vivo* [166]. Such an increased ASM proliferation and decreased apoptosis was confirmed *in vitro* only upon direct CD4⁺ T cells-ASM cells contact, highlighting the need for close cellular interaction between these two cell types [166]. These observations are in agreement with a previous study

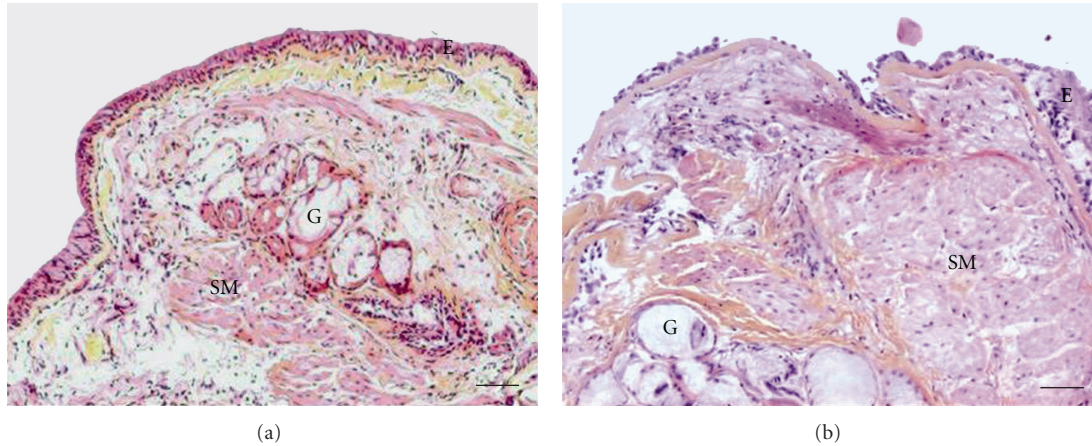


FIGURE 3: Representative optic microscopic from bronchial sections stained with Haematoxylin, Eosin, and safranin stain were obtained from (a) a control subject or (b) an asthmatic patient (printed from Bara et al. [12], with permission of European Respiratory Journal publisher) E: epithelium; G: mucous gland; SM: smooth muscle. Scale bars represent 50 μ m.

demonstrating *in vitro* a role for T cell in ASM DNA synthesis and proliferation in ASM cells from nonasthmatic patients [118]. The role of T cells in driving ASM remodelling was later confirmed in human asthmatics [15]. Moreover, the number of T cells infiltrating the asthmatic ASM correlates with ASM mass [15]. Collectively, these findings suggest an emerging role of T cells in both ASM hyperresponsiveness and remodelling.

On the other hand, ASM cells may also alter functional properties of T cells. Indeed, a direct contact between CD4⁺ T cells and ASM cells also enhances T cell survival, thus possibly contributing to the perpetuation of bronchial inflammation [166]. Moreover, cultured human nonasthmatic ASM cells are able to present superantigens *via* their MHC class II molecules to resting CD4⁺ T cells [168], which leads to CD4⁺ T cells activation, adherence between these cells, and finally release of IL-13, that, in turns, leads to increase in the contractile response to acetylcholine of isolated rabbit ASM tissues [168].

4. Role of ASM in Bronchial Remodelling

ASM remodelling represents a key feature of asthmatic bronchial remodelling [12] (Figure 3). Indeed, many lines of evidence demonstrate an increase in ASM mass in fatal [175] and nonfatal asthma [15, 61, 70, 142]. However, ASM remodelling is still insensitive to current asthma medications [176] that are usually effective in treating acute airway narrowing and bronchial inflammation. Furthermore, ASM cell plays also a role in promoting other bronchial remodelling structural alterations, in particular by virtue of its synthetic function. For instance, ASM cells can release biologically active TGF- β [177], which is involved in various structural alterations such as epithelial changes, subepithelial fibrosis, mucus hypersecretion, goblet cell hyperplasia, and angiogenesis [178].

The mechanisms underlying ASM remodelling involve ASM hyperplasia, ASM hypertrophy, and an excessive deposition of proteins of the ECM [12].

4.1. ASM Hyperplasia. Three mechanisms may account for ASM hyperplasia, that is, (i) ASM cell proliferation, (ii) reduced ASM cell apoptosis, and more recently (iii) migration of myofibroblasts within the ASM layer.

4.1.1. ASM Cell Proliferation. Compelling evidence now suggests an excessive ASM cell proliferation in asthma both *in vitro* [61, 62, 71, 179, 180] and *in vivo* [15, 181]. However, before these two recent studies [15, 181], the number of proliferative ASM cells *in vivo* was a matter of debate since the number of PCNA or Ki67 positive ASM cells was unchanged in asthmatic bronchial samples [6, 70]. The reason for this discrepancy is apparently related with the fixation process.

A wide array of mitogenic factors are known to promote ASM cell proliferation *in vitro*, including growth factors, cytokines, chemokines, inflammatory mediators, enzymes, ECM components, reactive oxygen species, and mechanical stress (Table 5). Such mitogenic factors promote ASM cell proliferation by activating pathways involving either receptor tyrosine kinase (RTK) or receptor coupled to heterotrimeric G proteins (GPCR) [182]. Upon activation of these receptors, downstream transduction pathways usually involve Ras, phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) or MAPK/ERK kinase (MEK) and extracellular signal-regulated kinase (ERK), which in turns induce cyclin D1 expression [182].

However, asthmatic ASM cells can also proliferate faster *in vitro* than nonasthmatic ASM cells irrespective of extracellular stimuli [179], hence supporting the view that an intrinsic ASM abnormality does exist in asthma. In this respect, ASM tissue-specific decreased levels of C/EBP α were found in asthmatics and could explain enhanced proliferation [71], through downregulation of the cell-cycle inhibitor p21. In addition, steroids are less effective in asthmatic ASM cells, since C/EBP α expression is impaired [71]. An alternative, or complementary, ASM tissue-specific explanation for the increased asthmatic ASM cell proliferation is an alteration of ASM calcium homeostasis. In severe asthma, an abnormal extracellular calcium entry leads to subsequent activation of peroxisome proliferator-activated receptor γ

TABLE 5: Mitogenic factors for human ASM cells.

Classification	References
<i>Growth factors/cytokines/chemokines</i>	
Platelet-derived growth factor (PDGF)	[211]
Fibroblast growth factor (FGF)	[212]
Epidermal growth factor (EGF)	[213]
Tumor necrosis factor- (TNF-) α (TNFSF2)	[214]
Transforming growth factor- (TGF-) β 1 (controversial)	[215, 216]
CCL3, 5, 11	[186]
CXCL8	[186]
<i>Inflammatory mediators</i>	
Histamine	[217]
Endothelin-1	[218]
Thromboxane A2	[219]
Sphingosine 1-phosphate	[220]
Cysteinyl leukotrienes (LTC4, LTD4, LTE4)	[221]
<i>Enzymes</i>	
Tryptase	[164]
Thrombin	[222]
Elastase	[223]
Matrix metalloproteinases	[224]
<i>ECM components</i>	
Fibronectin	[225]
Collagen I	[225]
<i>Others</i>	
Reactive oxygen species	[226]
Mechanical stress	[227]
Brain derived neurotrophic factor (BDNF)	[228]

coactivator-1 α (PGC-1 α), nuclear respiratory factor-1 (NRF-1), and mitochondrial transcription factor A (mtTFA) [61]. This transduction pathway results in an increased mitochondrial biogenesis leading to enhanced ASM proliferation [61] (Figure 1). Interestingly, such enhanced mitochondrial biogenesis was not observed in other cell types, such as endothelial or epithelial cells, highlighting the smooth muscle specificity of such findings [61]. More recently, ASM calcium homeostasis has also been shown to be impaired in nonsevere asthma, *via* a different mechanism [62]. Such mechanism implicates reduced SERCA2 expression in both native and cultured ASM cells, but origin of such defect in asthmatic ASM remains unknown [183] (Figure 1).

4.1.2. Reduced ASM Apoptosis. Another explanation is to consider that ASM hyperplasia may be due to an imbalance between ASM proliferation and death. However, little is known about processes that may counterbalance ASM proliferation, such as apoptosis. Indeed, by contrast to the substantial evidence supporting ASM proliferation, only few studies have investigated ASM cells survival signals, ASM cell spontaneous apoptosis, or their susceptibility to apoptosis in response to proapoptotic factors. Most of the current knowledge about apoptotic pathways in ASM originates from nonasthmatic ASM cells.

Cardiotrophin-1 [184], endothelin-1 [185], chemokines, such as CCL3, CCL5, CCL11, and CXCL8 [186], or some ECM components, including fibronectin, laminin, and collagens I and IV [187], inhibit nonasthmatic ASM cell apoptosis. ASM cells express *in vitro* the death receptors TNFR1 (TNFRSF1A), Fas (TNFRSF6), TRAILR1 (TNFRSF10A), TRAILR2 (TNFRSF10B) [188], and stimulation of ASM cells either with TNF- α (TNFSF2) [188, 189], soluble Fas ligand (TNFSF6) [188], Fas antibody [189], or TRAIL (TNFSF10) [188] induces cell apoptosis. Similarly, hydrogen peroxide-exposure decreases ASM cells survival and is prevented by overexpression of the small heat shock protein 27 (Hsp27), in part by upregulating glutathione levels [190]. ECM-degrading proteinase, such as neutrophil elastase, may also induce ASM cell apoptosis by triggering detachment from the ECM [191], which results in the withdrawal of survival signals usually provided by some ECM components [187]. Conversely, some ECM components, such as decorin, may also induce ASM cells apoptosis *in vitro* [192]. Some treatments are also able to induce nonasthmatic ASM cell apoptosis *in vitro*. Indeed, activation of peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ), which is expressed by ASM cells, by its synthetic ligand commonly used in diabetes treatment, may also induce apoptosis [193]. Moreover, simvastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, has recently been shown to trigger ASM cells apoptosis through the intrinsic apoptotic pathway involving p53, enhanced mitochondrial permeability, mitochondrial release of Smac and Omi, and inhibition of mitochondrial fission, which in turns leads to the activation of caspases 9, 7 and 3 [194]. However, the role of these different mediators and signalling pathways in asthmatic ASM cell survival remains unknown.

In asthma, the hypothesis of an imbalance between ASM proliferation and apoptosis is mainly supported by a rat model of T-cell driven remodelling [166]. Furthermore, an increased expression of TRAIL (TNFSF10) has also been shown *ex vivo* in asthmatic ASM following allergen challenge, suggesting that this cytokine may play a role in asthmatic ASM apoptosis [195]. Besides, active caspase 3 expression and double stranded DNA breaking were shown *ex vivo* in ASM, in severe asthma, and in case of fatal asthma, respectively [188]. Conversely, such findings were not reported in intermittent asthma [188] and Benayoun and coworkers failed to demonstrate active caspase 3 expression *ex vivo*, irrespective of asthma severity [196]. *In vitro*, two reports have also drawn negative results, showing no change in spontaneous apoptosis within asthmatic ASM cells [61, 161]. As a consequence, further studies remain to be undertaken to determine whether or not there is a change in asthmatic ASM cell apoptosis.

4.1.3. Migration of ASM Cells and Myofibroblasts. More recently, it has been suggested that migration of ASM precursor cells, either located within the bronchial wall or derived from peripheral blood fibroblast progenitors, towards the ASM bundles may also participate in ASM hyperplasia [197]. Cellular migration is characterized by significant cytoskeletal remodelling with apparition of filopodia and lamellipodia to

increase directed movement along a concentration gradient (chemotaxis) and/or nondirected movement (chemokinesis) [197].

Migration of myofibroblasts may participate in ASM hyperplasia, by differentiating to ASM-like cells [197]. Such an hypothesis was based on the microlocalization of myofibroblasts between ASM bundles [6], while an increased number of myofibroblasts has been demonstrated within the lamina reticularis, especially after allergen challenge [198], and within the lamina propria [15].

However, the origin of myofibroblasts remains a source of debate and several hypotheses have been put forward. First, myofibroblasts may come from resident fibroblasts that have differentiated [199] or from dedifferentiation of ASM cells themselves, which have migrated out of the ASM bundles towards the lumen [199]. Indeed, a wide range of mediators may promote *in vitro* human nonasthmatic ASM cell migration, such as cytokines, growth factors, chemokines, and some ECM components [197] (Table 6). The major transduction pathways so far identified for ASM cell migration involve PI3K, Rho-kinase, MAPK, p38, and phosphorylation of Hsp27 [197, 200]. Migration is also a strongly calcium-dependent process [62, 128]. Thus, enhanced cell spreading, which might reflect migration, was observed in asthmatic ASM cells lacking SERCA2, while knocking down SERCA2 using small interfering RNA in nonasthmatic ASM cells leads to earlier lamellipodia and enhanced cell spreading [62]. Whereas this first study suggests that asthmatic ASM cells might migrate more than nonasthmatic ASM cells [62], such findings require further investigations, as well as addressing directly ASM cell migration *in vivo*.

Myofibroblasts can also originate from epithelial cells undergoing phenotypic changes through epithelial-mesenchymal transition process [201–203]. Another hypothesis is that myofibroblasts come from the recruitment of circulating bone-marrow-derived progenitors, termed fibrocytes [204–208]. Fibrocytes may be identified by the coexpression of the stem cell marker CD34 and/or the panhematopoietic marker CD45 and collagen-1 [209]. In this setting, a growing body of evidence supports the concept of fibrocytes trafficking to the lung in asthma, both in mouse asthma models [204, 208] and in humans [204–207]. Indeed, fibrocyte localization has been found within the bronchial wall in asthma [204], in particular, within the ASM bundles irrespective of asthma severity [206], close to the basement membrane [207], in the lamina propria [206], or below the epithelium [204, 208]. Fibrocytes differentiate into myofibroblasts, as evidenced by the concomitant expression of fibrocyte markers and α -smooth muscle actin [204, 205]. Mechanisms underlying such fibrocyte chemotaxis to the lung are in part mediated by ASM secreted-PDGF [206], which also promotes fibrocyte differentiation to myofibroblast [205]. Besides, such chemotaxis might likewise involve the chemokine receptors CXCR4, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR7, and the chemokines CCL3, CCL4, CCL5, CCL7, CCL8, CCL11, and CCL13 [210]. Interestingly, circulating fibrocytes number is positively correlated to the slope of the yearly decline in FEV₁ [205],

TABLE 6: Promigratory factors for human ASM cells.

Factors	References
<i>Growth factors/cytokines/chemokines</i>	
FGF2, PDGF, TGF- α (TNFSF2), TGF- β	[229, 230]
IL-1 β , IL-17A, IL-17E, IL-22	[123, 230]
CCL5, 11, 19	[128, 231, 232]
CXCL8	[231]
Leukotriene E4	[233]
<i>ECM components</i>	
Collagens I, III, V	[233]
Fibronectin, laminin	[233]
<i>Enzymes</i>	
Matrix metalloproteinase- (MMP)-3	[234]
<i>Others</i>	
Thrombin	[235]
Urokinase plasminogen activator	[236]

once again suggesting a role of fibrocytes in ASM remodelling.

4.2. ASM Hypertrophy. Unlike ASM cell hyperplasia, evidence for ASM cell hypertrophy in asthma remains a matter of debate [6, 70, 74, 175]. In fact, increased ASM cell size has been reported in tissue specimens from intermittent [70], mild-to-moderate [70], severe [70], fatal [175], and atopic asthma [6]. However, conflicting findings were found in mild-to-moderate asthma [74]. As a consequence, it has been suggested that ASM cell hypertrophy might be a hallmark of severe asthma status, since it can discriminate patients with severe asthma from those with milder disease [70]. Interestingly, ASM cell hypertrophy was associated with an increased amount of MLCK, which is involved in AHR [70]. Nevertheless, whether ASM hypertrophy is a condition sufficient to induce AHR in asthma needs further investigations.

The underlying mechanisms of such ASM cell hypertrophy remain unknown in asthma. Cardiotrophin-1 [184], serum deprivation [237], TGF- β [238], and endothelin-1 [185] can drive ASM cell hypertrophy *in vitro*, and only in nonasthmatic ASM cells. More recently, the role of miRNA-26a, whose expression is increased by mechanical stretch, has been highlighted in ASM cell hypertrophy [239]. However, the role of these factors needs to be clarified in asthma, as well as the putative role of SERCA2, whose expression is known to be also reduced in cardiac hypertrophy [240].

Two distinct transduction pathways can lead to ASM cell hypertrophy [241]. Pathways can involve the mammalian target of rapamycin (mTOR), 4E-binding protein (4E-BP), the transcription factor eIF4E [242], and S6 kinase [243] or the inhibition of glycogen synthase kinase- (GSK-) 3 β [244], for instance, by the serine/threonine kinase Akt [241]. However, involvement of such transduction pathways needs to be further investigated in asthmatic ASM cell hypertrophy.

4.3. Altered ECM within the ASM Layer. Alteration in ECM represents another feature of ASM remodelling [12]. ECM is increased in asthma [6], as a result of increased deposition

of ECM proteins by airway resident cells, such as epithelial cells, fibroblasts, myofibroblasts, and ASM cells (Table 4). Its composition is different from that of nonasthmatics [139]. Histological examination of asthmatic bronchial samples reveals enhanced deposition of ECM proteins in the bronchial wall, such as collagens I, III, V, fibronectin, tenascin, hyaluronan, versican, laminin, lumican, and biglycan [245, 246], while collagen IV and elastin are decreased [247]. However, conflicting findings have also been reported regarding the amount of collagen III [248, 249], collagen IV [250] and elastin [251] in the asthmatic bronchial wall. Interestingly, ECM is also increased all around ASM cells regardless of asthma severity [6, 252]. Such increase may be due to decreased matrix metalloproteinases (MMPs), which degrade ECM proteins, and/or increased tissue inhibitors of MMPs (TIMPs). Thus, overexpression of TIMP-1 and TIMP-2 may account for low MMPs activity in asthma [138]. The profile of ECM proteins produced *in vitro* by asthmatic ASM cells is also different from that of nonasthmatic ASM cells, with more perlecan and collagen I, and less laminin- α 1 and collagen IV [253].

Nevertheless, whether such alterations in ASM ECM products contribute to modulate composition of the overall bronchial ECM remains unknown. Conversely, increasing evidence supports the role of ECM in modulating several aspects of ASM function [254]. In fact, fibronectin and collagen I have been reported to promote ASM proliferation from nonasthmatic donors in a dose-dependant fashion (Table 5), whereas laminin inhibits growth [255]. Fibronectin, collagens I, IV, and laminin also provide strong survival signals for ASM cells and such an effect is mediated at least in part through the fibronectin receptor/ α 5 β 1 integrin [187]. Moreover, ASM cell contact with membranes coated with ECM components, such as fibronectin, collagens III and V, has been shown to enhance ASM migration [233] (Table 6). Synthetic properties of ASM cells may also be modulated by ECM components, such as IL-1 β -dependent ASM secretion of CCL5 and CCL11 [256]. More recently, ECM has been involved in triggering ASM maturation to the contractile phenotype upon serum deprivation [257].

5. Conclusion

ASM cell plays a pivotal position in the pathophysiology of asthma as (i) a main effector of AHR, (ii) a proinflammatory and immunomodulatory cell through its synthetic properties and its expression of a wide range of cell surface molecules, and (iii) a leading cell involving in bronchial remodelling. If AHR and bronchial inflammation respond fairly well to conventional therapy such as bronchodilators and anti-inflammatory drugs, ASM remodelling remains insensitive to these treatments [176]. Targeting the various functions of ASM represents therefore a challenge for future asthma treatments [5, 12, 176]. In particular, research needs to focus on ways to prevent and/or reverse ASM remodelling. In this connection, targeting mitochondrial biogenesis and/or developing proapoptotic strategies to induce ASM cell death may represent an attractive area of investigation. In this respect, development of noninvasive tools for quantifying

ASM remodelling has received increasing attention in order to evaluate on a long-term basis the efficacy of such treatments [258].

References

- [1] W. W. Busse and R. F. Lemanske Jr., "Asthma," *The New England Journal of Medicine*, vol. 344, no. 5, pp. 350–362, 2001.
- [2] P. O. Girodet, A. Ozier, T. Trian et al., "Mast cell adhesion to bronchial smooth muscle in asthma specifically depends on CD51 and CD44 variant 6," *Allergy*, vol. 65, no. 8, pp. 1004–1012, 2010.
- [3] D. Denis, M. J. Fayon, P. Berger et al., "Prolonged moderate hyperoxia induces hyperresponsiveness and airway inflammation in newborn rats," *Pediatric Research*, vol. 50, no. 4, pp. 515–519, 2001.
- [4] J. L. Black and M. Roth, "Intrinsic asthma: is it intrinsic to the smooth muscle?" *Clinical and Experimental Allergy*, vol. 39, no. 7, pp. 962–965, 2009.
- [5] S. Zuyderduyn, M. B. Sukkar, A. Fust, S. Dhaliwal, and J. K. Burgess, "Treating asthma means treating airway smooth muscle cells," *European Respiratory Journal*, vol. 32, no. 2, pp. 265–274, 2008.
- [6] H. Begueret, P. Berger, J. M. Vernejoux, L. Dubuisson, R. Marthan, and J. M. Tunon-De-Lara, "Inflammation of bronchial smooth muscle in allergic asthma," *Thorax*, vol. 62, no. 1, pp. 8–15, 2007.
- [7] L. A. Laitinen, M. Heino, A. Laitinen et al., "Damage of the airway epithelium and bronchial reactivity in patients with asthma," *American Review of Respiratory Disease*, vol. 131, no. 4, pp. 599–606, 1985.
- [8] J. Bousquet, J. Y. Lacoste, P. Chanez, P. Vic, P. Godard, and F. B. Michel, "Bronchial elastic fibers in normal subjects and asthmatic patients," *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 153, no. 5, pp. 1648–1654, 1996.
- [9] M. S. Dunnill, G. R. Massarella, and J. A. Anderson, "A comparison of the quantitative anatomy of the bronchi in normal subjects, in status asthmaticus, in chronic bronchitis, and in emphysema," *Thorax*, vol. 24, no. 2, pp. 176–179, 1969.
- [10] N. G. Carroll, C. Cooke, and A. L. James, "Bronchial blood vessel dimensions in asthma," *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 155, no. 2, pp. 689–695, 1997.
- [11] N. Carroll, J. Elliot, A. Morton, and A. James, "The structure of large and small airways in nonfatal and fatal asthma," *American Review of Respiratory Disease*, vol. 147, no. 2, pp. 405–410, 1993.
- [12] I. Bara, A. Ozier, J. M. Tunon de Lara, R. Marthan, and P. Berger, "Pathophysiology of bronchial smooth muscle remodelling in asthma," *European Respiratory Journal*, vol. 36, no. 5, pp. 1174–1184, 2010.
- [13] C. Pepe, S. Foley, J. Shannon et al., "Differences in airway remodeling between subjects with severe and moderate asthma," *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 116, no. 3, pp. 544–549, 2005.
- [14] M. Kaminska, S. Foley, K. Maghni et al., "Airway remodeling in subjects with severe asthma with or without chronic persistent airflow obstruction," *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 124, no. 1, pp. e1–e4, 2009.
- [15] D. Ramos-Barbon, R. Fraga-Iriso, N. S. Brienza et al., "T cells localize with proliferating smooth muscle α -actin⁺ cell compartments in asthma," *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 182, no. 3, pp. 317–324, 2010.

- [16] J. S. Kim and B. K. Rubin, "Nasal and sinus inflammation in chronic obstructive pulmonary disease," *Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, vol. 4, no. 2, pp. 163–166, 2007.
- [17] N. Watson, H. Magnussen, and K. F. Rabe, "Pharmacological characterization of the muscarinic receptor subtype mediating contraction of human peripheral airways," *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 274, no. 3, pp. 1293–1297, 1995.
- [18] P. M. O'Byrne and M. D. Inman, "Airway hyperresponsiveness," *Chest*, vol. 123, no. 3, supplement, pp. 411S–416S, 2003.
- [19] S. D. Anderson, "Indirect challenge tests: airway hyperresponsiveness in asthma: its measurement and clinical significance," *Chest*, vol. 138, no. 2, supplement, pp. 25S–30S, 2010.
- [20] S. D. Anderson, "How does exercise cause asthma attacks?" *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, vol. 6, no. 1, pp. 37–42, 2006.
- [21] R. E. Altounyan, "Variation of drug action on airway obstruction in man," *Thorax*, vol. 19, pp. 406–415, 1964.
- [22] E. Adelroth, M. M. Morris, F. E. Hargreave, and P. M. O'Byrne, "Airway responsiveness to leukotrienes C4 and D4 and to methacholine in patients with asthma and normal controls," *The New England Journal of Medicine*, vol. 315, no. 8, pp. 480–484, 1986.
- [23] D. W. Cockcroft, D. N. Killian, J. J. Mellon, and F. E. Hargreave, "Bronchial reactivity to inhaled histamine: a method and clinical survey," *Clinical Allergy*, vol. 7, no. 3, pp. 235–243, 1977.
- [24] E. R. McFadden Jr. and I. A. Gilbert, "Exercise-induced asthma," *The New England Journal of Medicine*, vol. 330, no. 19, pp. 1362–1367, 1994.
- [25] J. W. Weiss, T. H. Rosling, E. R. McFadden Jr., and R. H. Ingram, "Relationship between bronchial responsiveness to hyperventilation with cold and methacholine in asthma," *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 72, no. 2, pp. 140–144, 1983.
- [26] S. Redline, I. B. Tager, R. G. Castile, S. T. Weiss, M. Barr, and F. E. Speizer, "Assessment of the usefulness of helium-oxygen maximal expiratory flow curves in epidemiologic studies of lung disease in children," *American Review of Respiratory Disease*, vol. 136, no. 4, pp. 834–840, 1987.
- [27] S. D. Anderson, J. Brannan, J. Spring et al., "A new method for bronchial-provocation testing in asthmatic subjects using a dry powder of mannitol," *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 156, no. 3, part 1, pp. 758–765, 1997.
- [28] G. Rosati, F. E. Hargreave, and E. H. Ramsdale, "Inhalation of adenosine 5'-monophosphate increases methacholine airway responsiveness," *Journal of Applied Physiology*, vol. 67, no. 2, pp. 792–796, 1989.
- [29] R. B. George and M. W. Owens, "Bronchial asthma," *Disease-a-Month*, vol. 37, no. 3, pp. 142–196, 1991.
- [30] P. Berger, J. M. Tunon-De-Lara, J. P. Savineau, and R. Marthan, "Selected contribution: tryptase-induced PAR-2-mediated Ca²⁺ signaling in human airway smooth muscle cells," *Journal of Applied Physiology*, vol. 91, no. 2, pp. 995–1003, 2001.
- [31] T. Trian, P. O. Girodet, O. Ousova, R. Marthan, J. M. Tunon-De-Lara, and P. Berger, "RNA interference decreases PAR-2 expression and function in human airway smooth muscle cells," *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, vol. 34, no. 1, pp. 49–55, 2006.
- [32] M. C. Liu, E. R. Bleecker, L. M. Lichtenstein et al., "Evidence for elevated levels of histamine, prostaglandin D₂, and other bronchoconstriction prostaglandins in the airways of subjects with mild asthma," *American Review of Respiratory Disease*, vol. 142, no. 1, pp. 126–132, 1990.
- [33] N. C. Barnes, P. J. Piper, and J. F. Costello, "Comparative effects of inhaled leukotriene C₄, leukotriene D₄, and histamine in normal human subjects," *Thorax*, vol. 39, no. 7, pp. 500–504, 1984.
- [34] S. E. Dahlen, P. Hedqvist, and P. Westlund, "Mechanisms of leukotriene-induced contractions of guinea pig airways: leukotriene C₄ has a potent direct action whereas leukotriene B₄ acts indirectly," *Acta Physiologica Scandinavica*, vol. 118, no. 4, pp. 393–403, 1983.
- [35] S. B. Schwartzberg, S. P. Shelov, and D. Van Praag, "Blood leukotriene levels during the acute asthma attack in children," *Prostaglandins Leukotrienes and Medicine*, vol. 26, no. 2, pp. 143–155, 1987.
- [36] G. Trakada, S. Tsourapis, M. Marangos, and K. Spiropoulos, "Arterial and bronchoalveolar lavage fluid endothelin-1 concentration in asthma," *Respiratory Medicine*, vol. 94, no. 10, pp. 992–996, 2000.
- [37] J. F. Perez-Zoghbi and M. J. Sanderson, "Endothelin-induced contraction of bronchiole and pulmonary arteriole smooth muscle cells is regulated by intracellular Ca²⁺ oscillations and Ca²⁺ sensitization," *American Journal of Physiology*, vol. 293, no. 4, pp. L1000–L1011, 2007.
- [38] P. H. Howarth, A. E. Redington, D. R. Springall et al., "Epithelially derived endothelin and nitric oxide in asthma," *International Archives of Allergy and Immunology*, vol. 107, no. 1–3, pp. 228–230, 1995.
- [39] R. Gosens, J. Zaagsma, M. Grootte Bromhaar, A. Nelemans, and H. Meurs, "Acetylcholine: a novel regulator of airway smooth muscle remodelling?" *European Journal of Pharmacology*, vol. 500, no. 1–3, pp. 193–201, 2004.
- [40] I. M. Adcock, M. Peters, C. Gelder, H. Shirasaki, C. R. Brown, and P. J. Barnes, "Increased tachykinin receptor gene expression in asthmatic lung and its modulation by steroids," *Journal of Molecular Endocrinology*, vol. 11, no. 1, pp. 1–7, 1993.
- [41] S. T. Holgate, G. Roberts, H. S. Arshad, P. H. Howarth, and D. E. Davies, "The role of the airway epithelium and its interaction with environmental factors in asthma pathogenesis," *Proceedings of the American Thoracic Society*, vol. 6, no. 8, pp. 655–659, 2009.
- [42] L. Woodman, S. Siddiqui, G. Cruse et al., "Mast cells promote airway smooth muscle cell differentiation via autocrine up-regulation of TGF- β 1," *Journal of Immunology*, vol. 181, no. 7, pp. 5001–5007, 2008.
- [43] C. L. Armour, P. R. Johnson, M. L. Alfredson, and J. L. Black, "Characterization of contractile prostanoid receptors on human airway smooth muscle," *European Journal of Pharmacology*, vol. 165, no. 2–3, pp. 215–222, 1989.
- [44] J. Xu and N. S. Zhong, "Mechanisms of bronchial hyperresponsiveness: the interaction of endothelin-1 and other cytokines," *Respirology*, vol. 4, no. 4, pp. 413–417, 1999.
- [45] E. Roux, M. Molimard, J. P. Savineau, and R. Marthan, "Muscarinic stimulation of airway smooth muscle cells," *General Pharmacology*, vol. 31, no. 3, pp. 349–356, 1998.
- [46] A. Ben-Jebria, R. Marthan, M. Rossetti, and J. P. Savineau, "Effect of passive sensitization on the mechanical activity of human isolated bronchial smooth muscle induced by substance P, neurokinin A and VIP," *British Journal of Pharmacology*, vol. 109, no. 1, pp. 131–136, 1993.

- [47] G. F. Joos, "The role of sensory neuropeptides in the pathogenesis of bronchial asthma," *Clinical and Experimental Allergy*, vol. 19, supplement 1, pp. 9–13, 1989.
- [48] E. H. Walters, C. Bevan, R. W. Parrish et al., "Time-dependent effect of prostaglandin E2 inhalation on airway responses to bronchoconstrictor agents in normal subjects," *Thorax*, vol. 37, no. 6, pp. 438–442, 1982.
- [49] P. J. Barnes, "Adrenergic and non-adrenergic, non-cholinergic control of airways," *Respiration*, vol. 50, no. 2, pp. 9–16, 1986.
- [50] C. Davis and M. S. Kannan, "Sympathetic innervation of human tracheal and bronchial smooth muscle," *Respiration Physiology*, vol. 68, no. 1, pp. 53–61, 1987.
- [51] R. J. Pack and P. S. Richardson, "The aminergic innervation of the human bronchus: a light and electron microscopic study," *Journal of Anatomy*, vol. 138, no. 3, pp. 493–502, 1984.
- [52] P. J. Barnes, "β-adrenergic receptors and their regulation," *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 152, no. 3, pp. 838–860, 1995.
- [53] V. H. van der Velden and A. R. Hulsmann, "Autonomic innervation of human airways: structure, function, and pathophysiology in asthma," *NeuroImmunomodulation*, vol. 6, no. 3, pp. 145–159, 1999.
- [54] A. Laitinen, M. Partanen, A. Hervonen et al., "VIP like immunoreactive nerves in human respiratory tract. Light and electron microscopic study," *Histochemistry*, vol. 82, no. 4, pp. 313–319, 1985.
- [55] A. El-Shazly, P. Berger, P. O. Girodet et al., "Fraktalkine produced by airway smooth muscle cells contributes to mast cell recruitment in asthma," *Journal of Immunology*, vol. 176, no. 3, pp. 1860–1868, 2006.
- [56] L. S. Chambers, J. L. Black, Q. Ge et al., "PAR-2 activation, PGE2, and COX-2 in human asthmatic and nonasthmatic airway smooth muscle cells," *American Journal of Physiology*, vol. 285, no. 3, pp. L619–L627, 2003.
- [57] H. Hakonarson, N. Maskeri, C. Carter, and M. M. Grunstein, "Regulation of TH1—and TH2-type cytokine expression and action in atopic asthmatic sensitized airway smooth muscle," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 103, no. 7, pp. 1077–1087, 1999.
- [58] J. C. Laporte, P. E. Moore, S. Baraldo et al., "Direct effects of interleukin-13 on signaling pathways for physiological responses in cultured human airway smooth muscle cells," *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 164, no. 1, pp. 141–148, 2001.
- [59] P. R. Johnson, A. J. Ammit, S. M. Carlin, C. L. Armour, G. H. Caughey, and J. L. Black, "Mast cell tryptase potentiates histamine-induced contraction in human sensitized bronchus," *European Respiratory Journal*, vol. 10, no. 1, pp. 38–43, 1997.
- [60] P. Berger, S. J. Compton, M. Molimard et al., "Mast cell tryptase as a mediator of hyperresponsiveness in human isolated bronchi," *Clinical and Experimental Allergy*, vol. 29, no. 6, pp. 804–812, 1999.
- [61] T. Trian, G. Benard, H. Begueret et al., "Bronchial smooth muscle remodeling involves calcium-dependent enhanced mitochondrial biogenesis in asthma," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 204, no. 13, pp. 3173–3181, 2007.
- [62] K. Mahn, S. J. Hirst, S. Ying et al., "Diminished sarco/endoplasmic reticulum Ca2+ ATPase (SERCA) expression contributes to airway remodelling in bronchial asthma," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 106, no. 26, pp. 10775–10780, 2009.
- [63] V. Sathish, M. A. Thompson, J. P. Bailey, C. M. Pabelick, Y. S. Prakash, and G. C. Sieck, "Effect of proinflammatory cytokines on regulation of sarcoplasmic reticulum Ca2+ reuptake in human airway smooth muscle," *American Journal of Physiology*, vol. 297, no. 1, pp. L26–L34, 2009.
- [64] D. A. Deshpande, S. Dogan, T. F. Walseth et al., "Modulation of calcium signaling by interleukin-13 in human airway smooth muscle: role of CD38/cyclic adenosine diphosphate ribose pathway," *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, vol. 31, no. 1, pp. 36–42, 2004.
- [65] D. A. Deshpande, T. F. Walseth, R. A. Panettieri, and M. S. Kannan, "CD38/cyclic ADP-ribose-mediated Ca2+ signaling contributes to airway smooth muscle hyper-responsiveness," *The FASEB Journal*, vol. 17, no. 3, pp. 452–454, 2003.
- [66] D. A. Deshpande, T. A. White, S. Dogan, T. F. Walseth, R. A. Panettieri, and M. S. Kannan, "CD38/cyclic ADP-ribose signaling: role in the regulation of calcium homeostasis in airway smooth muscle," *American Journal of Physiology*, vol. 288, no. 5, pp. L773–L788, 2005.
- [67] K. Parameswaran, L. J. Janssen, and P. M. O'Byrne, "Airway hyperresponsiveness and calcium handling by smooth muscle: a 'Deeper Look,'" *Chest*, vol. 121, no. 2, pp. 621–624, 2002.
- [68] J. P. Savineau and R. Marthan, "Activation properties of chemically skinned fibres from human isolated bronchial smooth muscle," *Journal of Physiology*, vol. 474, no. 3, pp. 433–438, 1994.
- [69] X. Ma, Z. Cheng, H. Kong et al., "Changes in biophysical and biochemical properties of single bronchial smooth muscle cells from asthmatic subjects," *American Journal of Physiology*, vol. 283, no. 6, pp. L1181–L1189, 2002.
- [70] L. Benayoun, A. Druilhe, M. C. Dombret, M. Aubier, and M. Pretolani, "Airway structural alterations selectively associated with severe asthma," *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 167, no. 10, pp. 1360–1368, 2003.
- [71] M. Roth, P. R. Johnson, P. Borger et al., "Dysfunctional interaction of C/EBP α and the glucocorticoid receptor in asthmatic bronchial smooth-muscle cells," *The New England Journal of Medicine*, vol. 351, no. 6, pp. 560–574, 2004.
- [72] P. Borger, M. Tamm, J. L. Black, and M. Roth, "Asthma: is it due to an abnormal airway smooth muscle cell?" *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 174, no. 4, pp. 367–372, 2006.
- [73] H. Marumoto, L. M. Moir, B. G. Oliver et al., "Comparison of gel contraction mediated by airway smooth muscle cells from patients with and without asthma," *Thorax*, vol. 62, no. 10, pp. 848–854, 2007.
- [74] P. G. Woodruff, G. M. Dolganov, R. E. Ferrando et al., "Hyperplasia of smooth muscle in mild to moderate asthma without changes in cell size or gene expression," *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 169, no. 9, pp. 1001–1006, 2004.
- [75] M. P. Walsh, J. E. Andrea, B. G. Allen, and O. Clement-Chomienne, "Smooth muscle protein kinase C," *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, vol. 72, no. 11, pp. 1392–1399, 1994.
- [76] J. P. Savineau and R. Marthan, "Modulation of the calcium sensitivity of the smooth muscle contractile apparatus: molecular mechanisms, pharmacological and pathophysiological implications," *Fundamental and Clinical Pharmacology*, vol. 11, no. 4, pp. 289–299, 1997.
- [77] Y. Chiba and M. Misawa, "The role of RhoA-mediated Ca2+ sensitization of bronchial smooth muscle contraction in

- airway hyperresponsiveness," *Journal of Smooth Muscle Research*, vol. 40, no. 4-5, pp. 155-167, 2004.
- [78] I. Hunter, H. J. Cobban, P. Vandenabeele, D. J. Macewan, and G. F. Nixon, "Tumor necrosis factor- α -induced activation of RhoA in airway smooth muscle cells: role in the Ca²⁺ sensitization of myosin light chain20 phosphorylation," *Molecular Pharmacology*, vol. 63, no. 3, pp. 714-721, 2003.
 - [79] Y. Chiba, S. Nakazawa, M. Todoroki, K. Shinozaki, H. Sakai, and M. Misawa, "Interleukin-13 augments bronchial smooth muscle contractility with an Up-regulation of RhoA protein," *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, vol. 40, no. 2, pp. 159-167, 2009.
 - [80] N. L. Stephens, W. Li, Y. Wang, and X. Ma, "The contractile apparatus of airway smooth muscle biophysics and biochemistry," *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 158, no. 5, part 3, pp. S80-S94, 1998.
 - [81] H. Jiang, K. Rao, A. J. Halayko, W. Kepron, and N. L. Stephens, "Bronchial smooth muscle mechanics of a canine model of allergic airway hyperresponsiveness," *Journal of Applied Physiology*, vol. 72, no. 1, pp. 39-45, 1992.
 - [82] C. L. Armour, L. M. Diment, and J. L. Black, "Relationship between smooth muscle volume and contractile response in airway tissue. Isometric versus isotonic measurement," *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 245, no. 2, pp. 687-691, 1988.
 - [83] B. E. McParland, P. T. Macklem, and P. D. Pare, "Airway wall remodeling: friend or foe?" *Journal of Applied Physiology*, vol. 95, no. 1, pp. 426-434, 2003.
 - [84] M. G. Tansey, K. Luby-Phelps, K. E. Kamm, and J. T. Stull, "Ca²⁺-dependent phosphorylation of myosin light chain kinase decreases the Ca²⁺ sensitivity of light chain phosphorylation within smooth muscle cells," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 269, no. 13, pp. 9912-9920, 1994.
 - [85] J. G. Garcia, V. Lazar, L. I. Gilbert-McClain, P. J. Gallagher, and A. D. Verin, "Myosin light chain kinase in endothelium: molecular cloning and regulation," *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, vol. 16, no. 5, pp. 489-494, 1997.
 - [86] G. Nino, A. Hu, J. S. Grunstein, and M. M. Grunstein, "Mechanism regulating proasthmatic effects of prolonged homologous β 2-adrenergic receptor desensitization in airway smooth muscle," *American Journal of Physiology*, vol. 297, no. 4, pp. L746-L757, 2009.
 - [87] J. Bonnevier and A. Arner, "Actions downstream of cyclic GMP/protein kinase G can reverse protein kinase C-mediated phosphorylation of CPI-17 and Ca²⁺ sensitization in smooth muscle," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, no. 28, pp. 28998-29003, 2004.
 - [88] Y. Nakatani, Y. Nishimura, T. Nishiuma, H. Maeda, and M. Yokoyama, "Tumor necrosis factor- α augments contraction and cytosolic Ca²⁺ sensitivity through phospholipase A2 in bovine tracheal smooth muscle," *European Journal of Pharmacology*, vol. 392, no. 3, pp. 175-182, 2000.
 - [89] S. Araki, M. Ito, Y. Kureishi et al., "Arachidonic acid-induced Ca²⁺ sensitization of smooth muscle contraction through activation of Rho-kinase," *Pflügers Archiv*, vol. 441, no. 5, pp. 596-603, 2001.
 - [90] A. P. Somlyo and A. V. Somlyo, "Signal transduction by G-proteins, Rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II," *Journal of Physiology*, vol. 522, part 2, pp. 177-185, 2000.
 - [91] J. M. Chalovich, A. Sen, A. Resetar et al., "Caldesmon: binding to actin and myosin and effects on elementary steps in the ATPase cycle," *Acta Physiologica Scandinavica*, vol. 164, no. 4, pp. 427-435, 1998.
 - [92] S. J. Winder and M. P. Walsh, "Smooth muscle calponin. Inhibition of actomyosin MgATPase and regulation by phosphorylation," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 265, no. 17, pp. 10148-10155, 1990.
 - [93] M. M. Grunstein, H. Veler, X. Shan, J. Larson, J. S. Grunstein, and S. Chuang, "Proasthmatic effects and mechanisms of action of the dust mite allergen, Der p 1, in airway smooth muscle," *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 116, no. 1, pp. 94-101, 2005.
 - [94] X. Shan, A. Hu, H. Veler et al., "Regulation of Toll-like receptor 4-induced proasthmatic changes in airway smooth muscle function by opposing actions of ERK1/2 and p38 MAPK signaling," *American Journal of Physiology*, vol. 291, no. 3, pp. L324-L333, 2006.
 - [95] T. Kaneko, M. Amano, A. Maeda et al., "Identification of calponin as a novel substrate of Rho-kinase," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 273, no. 1, pp. 110-116, 2000.
 - [96] S. Somara and K. N. Bitar, "Phosphorylated HSP27 modulates the association of phosphorylated caldesmon with tropomyosin in colonic smooth muscle," *American Journal of Physiology*, vol. 291, no. 4, pp. G630-G639, 2006.
 - [97] F. Li, M. Zhang, F. Hussain et al., "Inhibition of p38 MAPK-dependent bronchial contraction after ozone by corticosteroids," *European Respiratory Journal*, vol. 37, no. 4, pp. 933-942, 2011.
 - [98] Y. Bosse, E. P. Riesenfeld, P. D. Pare, and C. G. Irvin, "It's not all smooth muscle: non-smooth-muscle elements in control of resistance to airflow," *Annual Review of Physiology*, vol. 72, pp. 437-462, 2010.
 - [99] L. Peress, G. Sybrecht, and P. T. Macklem, "The mechanism of increase in total lung capacity during acute asthma," *American Journal of Medicine*, vol. 61, no. 2, pp. 165-169, 1976.
 - [100] A. F. Gelb, J. Licuanan, C. M. Shinar, and N. Zamel, "Unsuspected loss of lung elastic recoil in chronic persistent asthma," *Chest*, vol. 121, no. 3, pp. 715-721, 2002.
 - [101] H. F. Froeb and J. Mead, "Relative hysteresis of the dead space and lung in vivo," *Journal of Applied Physiology*, vol. 25, no. 3, pp. 244-248, 1968.
 - [102] N. Scichilone, S. Permutt, and A. Togias, "The lack of the bronchoprotective and not the bronchodilatory ability of deep inspiration is associated with airway hyperresponsiveness," *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 163, no. 2, pp. 413-419, 2001.
 - [103] T. Kapsali, S. Permutt, B. Laube, N. Scichilone, and A. Togias, "Potent bronchoprotective effect of deep inspiration and its absence in asthma," *Journal of Applied Physiology*, vol. 89, no. 2, pp. 711-720, 2000.
 - [104] P. Gayrard, J. Orehek, C. Grimaud, and J. Charpin, "Bronchoconstrictor effects of a deep inspiration in patients with asthma," *American Review of Respiratory Disease*, vol. 111, no. 4, pp. 433-439, 1975.
 - [105] R. Marthan and A. J. Woolcock, "Is a myogenic response involved in deep inspiration-induced bronchoconstriction in asthmatics?" *American Review of Respiratory Disease*, vol. 140, no. 5, pp. 1354-1358, 1989.
 - [106] T. K. Lim, S. M. Ang, T. H. Rossing, E. P. Ingenito, and R. H. Ingram, "The effects of deep inhalation on maximal expiratory flow during intensive treatment of spontaneous asthmatic episodes," *American Review of Respiratory Disease*, vol. 140, no. 2 I, pp. 340-343, 1989.

- [107] R. K. Lambert and P. D. Pare, "Lung parenchymal shear modulus, airway wall remodeling, and bronchial hyperresponsiveness," *Journal of Applied Physiology*, vol. 83, no. 1, pp. 140–147, 1997.
- [108] P. T. Macklem, "A theoretical analysis of the effect of airway smooth muscle load on airway narrowing," *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 153, no. 1, pp. 83–89, 1996.
- [109] P. D. Pare and T. R. Bai, "The consequences of chronic allergic inflammation," *Thorax*, vol. 50, no. 4, pp. 328–332, 1995.
- [110] J. J. Fredberg, D. Inouye, B. Miller et al., "Airway smooth muscle, tidal stretches, and dynamically determined contractile states," *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 156, no. 6, pp. 1752–1759, 1997.
- [111] J. J. Fredberg, "Frozen objects: small airways, big breaths, and asthma," *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 106, no. 4, pp. 615–624, 2000.
- [112] A. M. Bramley, C. R. Roberts, and R. R. Schellenberg, "Collagenase increases shortening of human bronchial smooth muscle in vitro," *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 152, no. 5, part 1, pp. 1513–1517, 1995.
- [113] R. A. Meiss, "Influence of intercellular tissue connections on airway muscle mechanics," *Journal of Applied Physiology*, vol. 86, no. 1, pp. 5–15, 1999.
- [114] J. W. Wilson, X. Li, and M. C. Pain, "The lack of distensibility of asthmatic airways," *American Review of Respiratory Disease*, vol. 148, no. 3, pp. 806–809, 1993.
- [115] G. Damera, O. Tliba, and R. A. Panettieri, "Airway smooth muscle as an immunomodulatory cell," *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics*, vol. 22, no. 5, pp. 353–359, 2009.
- [116] S. J. Hirst, "Regulation of airway smooth muscle cell immunomodulatory function: role in asthma," *Respiratory Physiology and Neurobiology*, vol. 137, no. 2–3, pp. 309–326, 2003.
- [117] H. Hakonarson, C. Kim, R. Whelan, D. Campbell, and M. M. Grunstein, "Bi-directional activation between human airway smooth muscle cells and T lymphocytes: role in induction of altered airway responsiveness," *Journal of Immunology*, vol. 166, no. 1, pp. 293–303, 2001.
- [118] A. L. Lazaar, S. M. Albelda, J. M. Pilewski, B. Brennan, E. Pure, and R. A. Panettieri, "T lymphocytes adhere to airway smooth muscle cells via integrins and CD44 and induce smooth muscle cell DNA synthesis," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 180, no. 3, pp. 807–816, 1994.
- [119] J. K. Burgess, S. Carlin, R. A. Pack et al., "Detection and characterization of OX40 ligand expression in human airway smooth muscle cells: a possible role in asthma?" *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 113, no. 4, pp. 683–689, 2004.
- [120] A. L. Lazaar, H. E. Reitz, R. A. Panettieri, S. P. Peters, and E. Pure, "Antigen receptor-stimulated peripheral blood and bronchoalveolar lavage-derived T Cells induce MHC class II and ICAM-1 expression on human airway smooth muscle," *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, vol. 16, no. 1, pp. 38–45, 1997.
- [121] M. B. Sukkar, S. Xie, N. M. Khorasani et al., "Toll-like receptor 2, 3, and 4 expression and function in human airway smooth muscle," *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 118, no. 3, pp. 641–648, 2006.
- [122] R. Saunders, A. Sutcliffe, D. Kaur et al., "Airway smooth muscle chemokine receptor expression and function in asthma," *Clinical and Experimental Allergy*, vol. 39, no. 11, pp. 1684–1692, 2009.
- [123] Y. Chang, L. Al-Alwan, P. A. Risse et al., "TH17 cytokines induce human airway smooth muscle cell migration," *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 127, no. 4, pp. 1046–1053, 2011.
- [124] J. L. Pype, L. J. Dupont, P. Menten et al., "Expression of monocyte chemotactic protein (MCP)-1, MCP-2, and MCP-3 by human airway smooth-muscle cells: modulation by corticosteroids and T-helper 2 cytokines," *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, vol. 21, no. 4, pp. 528–536, 1999.
- [125] M. John, S. J. Hirst, P. J. Jose et al., "Human airway smooth muscle cells express and release RANTES in response to T helper 1 cytokines: regulation by T helper 2 cytokines and corticosteroids," *Journal of Immunology*, vol. 158, no. 4, pp. 1841–1847, 1997.
- [126] O. Ghaffar, Q. Hamid, P. M. Renzi et al., "Constitutive and cytokine-stimulated expression of eotaxin by human airway smooth muscle cells," *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 159, no. 6, pp. 1933–1942, 1999.
- [127] D. S. Faffe, T. Whitehead, P. E. Moore et al., "IL-13 and IL-4 promote TARC release in human airway smooth muscle cells: role of IL-4 receptor genotype," *American Journal of Physiology*, vol. 285, no. 4, pp. L907–L914, 2003.
- [128] D. Kaur, R. Saunders, P. Berger et al., "Airway smooth muscle and mast cell-derived CC chemokine ligand 19 mediate airway smooth muscle migration in asthma," *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 174, no. 11, pp. 1179–1188, 2006.
- [129] M. L. Watson, S. P. Grix, N. J. Jordan et al., "Interleukin 8 and monocyte chemoattractant protein 1 production by cultured human airway smooth muscle cells," *Cytokine*, vol. 10, no. 5, pp. 346–352, 1998.
- [130] C. E. Brightling, A. J. Ammit, D. Kaur et al., "The CXCL10/CXCR3 axis mediates human lung mast cell migration to asthmatic airway smooth muscle," *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 171, no. 10, pp. 1103–1108, 2005.
- [131] J. A. Elias, Y. Wu, T. Zheng, and R. Panettieri, "Cytokine- and virus-stimulated airway smooth muscle cells produce IL-11 and other IL-6-type cytokines," *American Journal of Physiology*, vol. 273, no. 3, part 1, pp. L648–L655, 1997.
- [132] J. K. Burgess, P. R. Johnson, Q. Ge et al., "Expression of connective tissue growth factor in asthmatic airway smooth muscle cells," *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 167, no. 1, pp. 71–77, 2003.
- [133] M. P. Hallsworth, C. P. Soh, C. H. Twort, T. H. Lee, and S. J. Hirst, "Cultured human airway smooth muscle cells stimulated by interleukin-1 β enhance eosinophil survival," *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, vol. 19, no. 6, pp. 910–919, 1998.
- [134] O. Kassel, F. Schmidlin, C. Duvernelle, B. Gasser, G. Massard, and N. Frossard, "Human bronchial smooth muscle cells in culture produce stem cell factor," *European Respiratory Journal*, vol. 13, no. 5, pp. 951–954, 1999.
- [135] S. McKay, J. C. de Jongste, P. R. Saxena, and H. S. Sharma, "Angiotensin II induces hypertrophy of human airway smooth muscle cells: expression of transcription factors and transforming growth factor- β 1," *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, vol. 18, no. 6, pp. 823–833, 1998.
- [136] A. J. Knox, L. Corbett, J. Stocks, E. Holland, Y. M. Zhu, and L. Pang, "Human airway smooth muscle cells secrete vascular endothelial growth factor: up-regulation by bradykinin via a protein kinase C and prostanoid-dependent mechanism," *The FASEB Journal*, vol. 15, no. 13, pp. 2480–2488, 2001.

- [137] P. R. Johnson, J. L. Black, S. Carlin, Q. Ge, and P. A. Underwood, "The production of extracellular matrix proteins by human passively sensitized airway smooth-muscle cells in culture: the effect of beclomethasone," *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 162, no. 6, pp. 2145–2151, 2000.
- [138] S. R. Elshaw, N. Henderson, A. J. Knox, S. A. Watson, D. J. Buttle, and S. R. Johnson, "Matrix metalloproteinase expression and activity in human airway smooth muscle cells," *British Journal of Pharmacology*, vol. 142, no. 8, pp. 1318–1324, 2004.
- [139] B. B. Araujo, M. Dolhnikoff, L. F. Silva et al., "Extracellular matrix components and regulators in the airway smooth muscle in asthma," *European Respiratory Journal*, vol. 32, no. 1, pp. 61–69, 2008.
- [140] C. E. Brightling, P. Bradding, F. A. Symon, S. T. Holgate, A. J. Wardlaw, and I. D. Pavord, "Mast-cell infiltration of airway smooth muscle in asthma," *The New England Journal of Medicine*, vol. 346, no. 22, pp. 1699–1705, 2002.
- [141] T. Koshino, S. Teshima, N. Fukushima et al., "Identification of basophils by immunohistochemistry in the airways of post-mortem cases of fatal asthma," *Clinical and Experimental Allergy*, vol. 23, no. 11, pp. 919–925, 1993.
- [142] K. Amin, C. Janson, G. Boman, and P. Venge, "The extracellular deposition of mast cell products is increased in hypertrophic airways smooth muscles in allergic asthma but not in nonallergic asthma," *Allergy*, vol. 60, no. 10, pp. 1241–1247, 2005.
- [143] N. G. Carroll, S. Mutavdzic, and A. L. James, "Distribution and degranulation of airway mast cells in normal and asthmatic subjects," *European Respiratory Journal*, vol. 19, no. 5, pp. 879–885, 2002.
- [144] P. Berger, P. O. Girodet, H. Begueret et al., "Tryptase-stimulated human airway smooth muscle cells induce cytokine synthesis and mast cell chemotaxis," *The FASEB Journal*, vol. 17, no. 14, pp. 2139–2141, 2003.
- [145] S. Siddiqui, V. Mistry, C. Doe et al., "Airway hyperresponsiveness is dissociated from airway wall structural remodeling," *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 122, no. 2, pp. 335.e1–341.e3, 2008.
- [146] S. K. Saha, M. A. Berry, D. Parker et al., "Increased sputum and bronchial biopsy IL-13 expression in severe asthma," *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 121, no. 3, pp. 685–691, 2008.
- [147] D. Kaur, R. Saunders, F. Hollins et al., "Mast cell fibroblastoid differentiation mediated by airway smooth muscle in asthma," *Journal of Immunology*, vol. 185, no. 10, pp. 6105–6114, 2010.
- [148] A. J. Ammit, S. S. Bekir, P. R. Johnson, J. M. Hughes, C. L. Armour, and J. L. Black, "Mast cell numbers are increased in the smooth muscle of human sensitized isolated bronchi," *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 155, no. 3, pp. 1123–1129, 1997.
- [149] P. Berger, A. F. Walls, R. Marthan, and J. M. Tunon-de-Lara, "Immunoglobulin E-induced passive sensitization of human airways: an immunohistochemical study," *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 157, no. 2, pp. 610–616, 1998.
- [150] P. Berger, J. Lavalley, R. Rouiller, F. Laurent, R. Marthan, and J. M. Tunon-De-Lara, "Assessment of bronchial inflammation using an automated cell recognition system based on colour analysis," *European Respiratory Journal*, vol. 14, no. 6, pp. 1394–1402, 1999.
- [151] P. Berger, C. N' guyen, M. Buckley, E. Scotto-Gomez, R. Marthan, and J. M. Tunon-De-Lara, "Passive sensitization of human airways induces mast cell degranulation and release of tryptase," *Allergy*, vol. 57, no. 7, pp. 592–599, 2002.
- [152] P. Berger, F. Laurent, H. Begueret et al., "Structure and function of small airways in smokers: relationship between air trapping at CT and airway inflammation," *Radiology*, vol. 228, no. 1, pp. 85–94, 2003.
- [153] P. Berger, P. O. Girodet, and J. M. Tunon-de-Lara, "Mast cell myositis: a new feature of allergic asthma?" *Allergy*, vol. 60, no. 10, pp. 1238–1240, 2005.
- [154] M. Berry, A. Morgan, D. E. Shaw et al., "Pathological features and inhaled corticosteroid response of eosinophilic and non-eosinophilic asthma," *Thorax*, vol. 62, no. 12, pp. 1043–1049, 2007.
- [155] A. Sutcliffe, D. Kaur, S. Page et al., "Mast cell migration to Th2 stimulated airway smooth muscle from asthmatics," *Thorax*, vol. 61, no. 8, pp. 657–662, 2006.
- [156] W. Yang, D. Kaur, Y. Okayama et al., "Human lung mast cells adhere to human airway smooth muscle, in part, via tumor suppressor in lung cancer-1," *Journal of Immunology*, vol. 176, no. 2, pp. 1238–1243, 2006.
- [157] F. Hollins, D. Kaur, W. Yang et al., "Human airway smooth muscle promotes human lung mast cell survival, proliferation, and constitutive activation: cooperative roles for CADM1, stem cell factor, and IL-6," *Journal of Immunology*, vol. 181, no. 4, pp. 2772–2780, 2008.
- [158] R. J. Carter and P. Bradding, "The role of mast cells in the structural alterations of the airways as a potential mechanism in the pathogenesis of severe asthma," *Current Pharmaceutical Design*, vol. 17, no. 7, pp. 685–698, 2011.
- [159] C. E. Brightling, F. A. Symon, S. T. Holgate, A. J. Wardlaw, I. D. Pavord, and P. Bradding, "Interleukin-4 and -13 expression is co-localized to mast cells within the airway smooth muscle in asthma," *Clinical and Experimental Allergy*, vol. 33, no. 12, pp. 1711–1716, 2003.
- [160] P. Bradding, A. F. Walls, and S. T. Holgate, "The role of the mast cell in the pathophysiology of asthma," *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 117, no. 6, pp. 1277–1284, 2006.
- [161] D. Kaur, F. Hollins, R. Saunders et al., "Airway smooth muscle proliferation and survival is not modulated by mast cells," *Clinical and Experimental Allergy*, vol. 40, no. 2, pp. 279–288, 2010.
- [162] E. B. Thangam, R. T. Venkatesha, A. K. Zaidi et al., "Airway smooth muscle cells enhance C3a-induced mast cell degranulation following cell-cell contact," *The FASEB Journal*, vol. 19, no. 7, pp. 798–800, 2005.
- [163] J. F. Molinari, M. Scuri, W. R. Moore, J. Clark, R. Tanaka, and W. M. Abraham, "Inhaled tryptase causes bronchoconstriction in sheep via histamine release," *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 154, no. 3, part 1, pp. 649–653, 1996.
- [164] P. Berger, D. W. Perng, H. Thabrew et al., "Tryptase and agonists of PAR-2 induce the proliferation of human airway smooth muscle cells," *Journal of Applied Physiology*, vol. 91, no. 3, pp. 1372–1379, 2001.
- [165] R. Saunders, A. Sutcliffe, L. Woodman et al., "The airway smooth muscle CCR3/CCL11 axis is inhibited by mast cells," *Allergy*, vol. 63, no. 9, pp. 1148–1155, 2008.
- [166] D. Ramos-Barbon, J. F. Presley, Q. A. Hamid, E. D. Fixman, and J. G. Martin, "Antigen-specific CD4+ T cells drive airway smooth muscle remodeling in experimental asthma," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 115, no. 6, pp. 1580–1589, 2005.

- [167] A. L. Lazaar, M. I. Plotnick, U. Kucich et al., "Mast cell chymase modifies cell-matrix interactions and inhibits mitogen-induced proliferation of human airway smooth muscle cells," *Journal of Immunology*, vol. 169, no. 2, pp. 1014–1020, 2002.
- [168] H. Veler, A. Hu, S. Fatma et al., "Superantigen presentation by airway smooth muscle to CD4+ T lymphocytes elicits reciprocal proasthmatic changes in airway function," *Journal of Immunology*, vol. 178, no. 6, pp. 3627–3636, 2007.
- [169] A. L. Lazaar, Y. Amrani, J. Hsu et al., "CD40-mediated signal transduction in human airway smooth muscle," *Journal of Immunology*, vol. 161, no. 6, pp. 3120–3127, 1998.
- [170] J. K. Burgess, A. E. Blake, S. Boustany et al., "CD40 and OX40 ligand are increased on stimulated asthmatic airway smooth muscle," *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 115, no. 2, pp. 302–308, 2005.
- [171] D. I. Krimmer, M. Loseli, J. M. Hughes et al., "CD40 and OX40 ligand are differentially regulated on asthmatic airway smooth muscle," *Allergy*, vol. 64, no. 7, pp. 1074–1082, 2009.
- [172] S. Siddiqui, V. Mistry, C. Doe, S. Stinson, M. Foster, and C. Brightling, "Airway wall expression of OX40/OX40L and Interleukin-4 in asthma," *Chest*, vol. 137, no. 4, pp. 797–804, 2010.
- [173] Y. Xu and G. Song, "The role of CD40-CD154 interaction in cell immunoregulation," *Journal of Biomedical Science*, vol. 11, no. 4, pp. 426–438, 2004.
- [174] T. Fujita, N. Ukyo, T. Hori, and T. Uchiyama, "Functional characterization of OX40 expressed on human CD8+ T cells," *Immunology Letters*, vol. 106, no. 1, pp. 27–33, 2006.
- [175] M. Ebina, T. Takahashi, T. Chiba, and M. Motomiya, "Cellular hypertrophy and hyperplasia of airway smooth muscles underlying bronchial asthma: a 3-D morphometric study," *American Review of Respiratory Disease*, vol. 148, no. 3, pp. 720–726, 1993.
- [176] P. O. Girodet, A. Ozier, I. Bara, J. M. Tunon De Lara, R. Marthan, and P. Berger, "Airway remodeling in asthma: new mechanisms and potential for pharmacological intervention," *Pharmacology and Therapeutics*, vol. 130, no. 3, pp. 325–337, 2011.
- [177] A. Coutts, G. Chen, N. Stephens et al., "Release of biologically active TGF- β from airway smooth muscle cells induces autocrine synthesis of collagen," *American Journal of Physiology*, vol. 280, no. 5, pp. L999–L1008, 2001.
- [178] R. Halwani, S. Al-Muhsen, H. Al-Jahdali, and Q. Hamid, "Role of transforming growth factor- β in airway remodeling in asthma," *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, vol. 44, no. 2, pp. 127–133, 2011.
- [179] P. R. A. Johnson, M. Roth, M. Tamm et al., "Airway smooth muscle cell proliferation is increased in asthma," *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 164, no. 3, pp. 474–477, 2001.
- [180] J. K. Burgess, H. L. Jin, Q. I. Ge et al., "Dual ERK and phosphatidylinositol 3-kinase pathways control airway smooth muscle proliferation: differences in asthma," *Journal of Cellular Physiology*, vol. 216, no. 3, pp. 673–679, 2008.
- [181] M. Hassan, T. Jo, P. A. Risse et al., "Airway smooth muscle remodeling is a dynamic process in severe long-standing asthma," *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 125, no. 5, pp. 1037–1045.e3, 2010.
- [182] O. Tliba and R. A. Panettieri Jr., "Noncontractile functions of airway smooth muscle cells in asthma," *Annual Review of Physiology*, vol. 71, pp. 509–535, 2009.
- [183] K. Mahn, O. O. Ojo, G. Chadwick, P. I. Aaronson, J. P. T. Ward, and T. H. Lee, "Ca²⁺ homeostasis and structural and functional remodelling of airway smooth muscle in asthma," *Thorax*, vol. 65, no. 6, pp. 547–552, 2010.
- [184] D. Zhou, X. Zheng, L. Wang et al., "Expression and effects of cardiotrophin-1 (CT-1) in human airway smooth muscle cells," *British Journal of Pharmacology*, vol. 140, no. 7, pp. 1237–1244, 2003.
- [185] R. McWhinnie, D. V. Pechkovsky, D. Zhou et al., "Endothelin-1 induces hypertrophy and inhibits apoptosis in human airway smooth muscle cells," *American Journal of Physiology*, vol. 292, no. 1, pp. L278–L286, 2007.
- [186] R. Halwani, J. Al-Abri, M. Beland et al., "CC and CXC chemokines induce airway smooth muscle proliferation and survival," *Journal of Immunology*, vol. 186, no. 7, pp. 4156–4163, 2011.
- [187] A. M. Freyer, S. R. Johnson, and I. P. Hall, "Effects of growth factors and extracellular matrix on survival of human airway smooth muscle cells," *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, vol. 25, no. 5, pp. 569–576, 2001.
- [188] K. Solarewicz-Madejek, T. M. Basinski, R. Crameri et al., "T cells and eosinophils in bronchial smooth muscle cell death in asthma," *Clinical and Experimental Allergy*, vol. 39, no. 6, pp. 845–855, 2009.
- [189] K. J. Hamann, J. E. Vieira, A. J. Halayko et al., "Fas cross-linking induces apoptosis in human airway smooth muscle cells," *American Journal of Physiology*, vol. 278, no. 3, pp. L618–L624, 2000.
- [190] S. Salinthon, M. Ba, L. Hanson, J. L. Martin, A. J. Halayko, and W. T. Gerthoffer, "Overexpression of human Hsp27 inhibits serum-induced proliferation in airway smooth muscle myocytes and confers resistance to hydrogen peroxide cytotoxicity," *American Journal of Physiology*, vol. 293, no. 5, pp. L1194–L1207, 2007.
- [191] U. Oltmanns, M. B. Sukkar, S. Xie, M. John, and K. F. Chung, "Induction of human airway smooth muscle apoptosis by neutrophils and neutrophil elastase," *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, vol. 32, no. 4, pp. 334–341, 2005.
- [192] M. L. D'Antoni, C. Torregiani, P. Ferraro et al., "Effects of decorin and biglycan on human airway smooth muscle cell proliferation and apoptosis," *American Journal of Physiology*, vol. 294, no. 4, pp. L764–L771, 2008.
- [193] H. J. Patel, M. G. Belvisi, D. Bishop-Bailey, M. H. Yacoub, and J. A. Mitchell, "Activation of peroxisome proliferator-activated receptors in human airway smooth muscle cells has a superior anti-inflammatory profile to corticosteroids: relevance for chronic obstructive pulmonary disease therapy," *Journal of Immunology*, vol. 170, no. 5, pp. 2663–2669, 2003.
- [194] S. Ghavami, M. M. Mutawe, K. Hauff et al., "Statin-triggered cell death in primary human lung mesenchymal cells involves p53-PUMA and release of Smac and Omi but not cytochrome c," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1803, no. 4, pp. 452–467, 2010.
- [195] N. M. Robertson, J. G. Zangrilli, A. Stepkowski et al., "Differential expression of TRAIL and TRAIL receptors in allergic asthmatics following segmental antigen challenge: evidence for a role of TRAIL in eosinophil survival," *Journal of Immunology*, vol. 169, no. 10, pp. 5986–5996, 2002.
- [196] L. Benayoun, S. Letuve, A. Druilhe et al., "Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor γ expression in human asthmatic airways: relationship with proliferation, apoptosis, and airway remodeling," *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 164, no. 8, part 1, pp. 1487–1494, 2001.

- [197] W. T. Gerthoffer, "Migration of airway smooth muscle cells," *Proceedings of the American Thoracic Society*, vol. 5, no. 1, pp. 97–105, 2008.
- [198] M. J. Gizycki, E. Adelroth, A. V. Rogers, P. M. O'Byrne, and P. K. Jeffery, "Myofibroblast involvement in the allergen-induced late response in mild atopic asthma," *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, vol. 16, no. 6, pp. 664–673, 1997.
- [199] D. W. Powell, R. C. Mifflin, J. D. Valentich, S. E. Crowe, J. I. Saada, and A. B. West, "Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease," *American Journal of Physiology*, vol. 277, no. 1, part 1, pp. C1–C19, 1999.
- [200] S. J. Hirst, J. G. Martin, J. V. Bonacci et al., "Proliferative aspects of airway smooth muscle," *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 114, no. 2, supplement, pp. S2–S17, 2004.
- [201] M. Iwano, D. Plieth, T. M. Danoff, C. Xue, H. Okada, and E. G. Neilson, "Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 110, no. 3, pp. 341–350, 2002.
- [202] R. Kalluri and E. G. Neilson, "Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 112, no. 12, pp. 1776–1784, 2003.
- [203] B. C. Willis, R. M. DuBois, and Z. Borok, "Epithelial origin of myofibroblasts during fibrosis in the lung," *Proceedings of the American Thoracic Society*, vol. 3, no. 4, pp. 377–382, 2006.
- [204] M. Schmidt, G. Sun, M. A. Stacey, L. Mori, and S. Mattoli, "Identification of circulating fibrocytes as precursors of bronchial myofibroblasts in asthma," *Journal of Immunology*, vol. 171, no. 1, pp. 380–389, 2003.
- [205] C. H. Wang, C. D. Huang, H. C. Lin et al., "Increased circulating fibrocytes in asthma with chronic airflow obstruction," *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 178, no. 6, pp. 583–591, 2008.
- [206] R. Saunders, S. Siddiqui, D. Kaur et al., "Fibrocyte localization to the airway smooth muscle is a feature of asthma," *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 123, no. 2, pp. 376–384, 2009.
- [207] K. Nihlberg, K. Larsen, A. Hultgardh-Nilsson et al., "Tissue fibrocytes in patients with mild asthma: a possible link to thickness of reticular basement membrane?" *Respiratory Research*, vol. 7, p. 50, 2006.
- [208] Y. L. Ye, H. T. Wu, C. F. Lin et al., "Dermatophagoides pteronyssinus 2 regulates nerve growth factor release to induce airway inflammation via a reactive oxygen species-dependent pathway," *American Journal of Physiology*, vol. 300, no. 2, pp. L216–L224, 2011.
- [209] R. A. Reilkoff, R. Bucala, and E. L. Herzog, "Fibrocytes: emerging effector cells in chronic inflammation," *Nature Reviews Immunology*, vol. 11, no. 6, pp. 427–435, 2011.
- [210] R. M. Strieter, B. N. Gomperts, and M. P. Keane, "The role of CX chemokines in pulmonary fibrosis," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 117, no. 3, pp. 549–556, 2007.
- [211] S. J. Hirst, P. J. Barnes, and C. H. Twort, "PDGF isoform-induced proliferation and receptor expression in human cultured airway smooth muscle cells," *American Journal of Physiology*, vol. 270, no. 3, part 1, pp. L415–L428, 1996.
- [212] K. M. Hawker, P. R. Johnson, J. M. Hughes, and J. L. Black, "Interleukin-4 inhibits mitogen-induced proliferation of human airway smooth muscle cells in culture," *American Journal of Physiology*, vol. 275, no. 3, part 1, pp. L469–L477, 1998.
- [213] R. A. Panettieri Jr., R. G. Goldie, P. J. Rigby, A. J. Eszterhas, and D. W. P. Hay, "Endothelin-1-induced potentiation of human airway smooth muscle proliferation: an ETA receptor-mediated phenomenon," *British Journal of Pharmacology*, vol. 118, no. 1, pp. 191–197, 1996.
- [214] A. G. Stewart, P. R. Tomlinson, D. J. Fernandes, J. W. Wilson, and T. Harris, "Tumor necrosis factor α modulates mitogenic responses of human cultured airway smooth muscle," *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, vol. 12, no. 1, pp. 110–119, 1995.
- [215] M. D. Cohen, V. Ciocca, and R. A. Panettieri Jr., "TGF- β 1 modulates human airway smooth-muscle cell proliferation induced by mitogens," *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, vol. 16, no. 1, pp. 85–90, 1997.
- [216] S. Xie, M. B. Sukkar, R. Issa, N. M. Khorasani, and K. F. Chung, "Mechanisms of induction of airway smooth muscle hyperplasia by transforming growth factor- β ," *American Journal of Physiology*, vol. 293, no. 1, pp. L245–L253, 2007.
- [217] K. Maruno, A. Absood, and S. I. Said, "VIP inhibits basal and histamine-stimulated proliferation of human airway smooth muscle cells," *American Journal of Physiology*, vol. 268, no. 6, part 1, pp. L1047–L1051, 1995.
- [218] P. R. Tomlinson, J. W. Wilson, and A. G. Stewart, "Inhibition by salbutamol of the proliferation of human airway smooth muscle cells grown in culture," *British Journal of Pharmacology*, vol. 111, no. 2, pp. 641–647, 1994.
- [219] V. Capra, A. Habib, M. R. Accomazzo et al., "Thromboxane prostanoid receptor in human airway smooth muscle cells: a relevant role in proliferation," *European Journal of Pharmacology*, vol. 474, no. 2–3, pp. 149–159, 2003.
- [220] A. J. Ammit, A. T. Hastie, L. C. Edsall et al., "Sphingosine 1-phosphate modulates human airway smooth muscle cell functions that promote inflammation and airway remodeling in asthma," *The FASEB Journal*, vol. 15, no. 7, pp. 1212–1214, 2001.
- [221] S. Ravasi, S. Citro, B. Viviani, V. Capra, and G. E. Rovati, "CysLT1 receptor-induced human airway smooth muscle cells proliferation requires ROS generation, EGF receptor transactivation and ERK1/2 phosphorylation," *Respiratory Research*, vol. 7, article 42, 2006.
- [222] R. A. Panettieri, I. P. Hall, C. S. Maki, and R. K. Murray, " α -Thrombin increases cytosolic calcium and induces human airway smooth muscle cell proliferation," *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, vol. 13, no. 2, pp. 205–216, 1995.
- [223] C. D. Huang, H. H. Chen, C. H. Wang et al., "Human neutrophil-derived elastase induces airway smooth muscle cell proliferation," *Life Sciences*, vol. 74, no. 20, pp. 2479–2492, 2004.
- [224] N. A. Hasaneen, S. Zucker, J. Cao, C. Chiarelli, R. A. Panettieri, and H. D. Foda, "Cyclic mechanical strain-induced proliferation and migration of human airway smooth muscle cells: role of EMMPRIN and MMPs," *The FASEB Journal*, vol. 19, no. 11, pp. 1507–1509, 2005.
- [225] T. T. Nguyen, J. P. Ward, and S. J. Hirst, " β 1-integrins mediate enhancement of airway smooth muscle proliferation by collagen and fibronectin," *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 171, no. 3, pp. 217–223, 2005.
- [226] H. C. Pandya, V. A. Snetkov, C. H. Twort, J. P. Ward, and S. J. Hirst, "Oxygen regulates mitogen-stimulated proliferation of fetal human airway smooth muscle cells," *American Journal of Physiology*, vol. 283, no. 6, pp. L1220–L1230, 2002.
- [227] P. G. Smith, K. E. Janiga, and M. C. Bruce, "Strain increases airway smooth muscle cell proliferation," *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, vol. 10, no. 1, pp. 85–90, 1994.

- [228] B. Aravamudan, M. Thompson, C. Pabelick et al., "Brain derived neurotrophic factor induces proliferation of human airway smooth muscle cells," *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. In press.
- [229] E. A. Goncharova, C. K. Billington, C. Irani et al., "Cyclic AMP-mobilizing agents and glucocorticoids modulate human smooth muscle cell migration," *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, vol. 29, no. 1, pp. 19–27, 2003.
- [230] J. C. Hedges, M. A. Dechert, I. A. Yamboliev et al., "A role for p38(MAPK)/HSP27 pathway in smooth muscle cell migration," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, no. 34, pp. 24211–24219, 1999.
- [231] N. Takeda, Y. Sumi, D. Prefontaine et al., "Epithelium-derived chemokines induce airway smooth muscle cell migration," *Clinical and Experimental Allergy*, vol. 39, no. 7, pp. 1018–1026, 2009.
- [232] P. Joubert, S. Lajoie-Kadoch, I. Labonte et al., "CCR3 expression and function in asthmatic airway smooth muscle cells," *Journal of Immunology*, vol. 175, no. 4, pp. 2702–2708, 2005.
- [233] K. Parameswaran, K. Radford, J. Zuo, L. J. Janssen, P. M. O'Byrne, and P. G. Cox, "Extracellular matrix regulates human airway smooth muscle cell migration," *European Respiratory Journal*, vol. 24, no. 4, pp. 545–551, 2004.
- [234] I. Ito, E. D. Fixman, K. Asai et al., "Platelet-derived growth factor and transforming growth factor- β modulate the expression of matrix metalloproteinases and migratory function of human airway smooth muscle cells," *Clinical and Experimental Allergy*, vol. 39, no. 9, pp. 1370–1380, 2009.
- [235] N. Henderson, L. J. Markwick, S. R. Elshaw, A. M. Freyer, A. J. Knox, and S. R. Johnson, "Collagen I and thrombin activate MMP-2 by MMP-14-dependent and -independent pathways: implications for airway smooth muscle migration," *American Journal of Physiology*, vol. 292, no. 4, pp. L1030–L1038, 2007.
- [236] E. A. Goncharova, A. V. Vorotnikov, E. O. Gracheva et al., "Activation of p38 MAP-kinase and caldesmon phosphorylation are essential for urokinase-induced human smooth muscle cell migration," *Biological Chemistry*, vol. 383, no. 1, pp. 115–126, 2002.
- [237] A. J. Halayko, S. Kartha, G. L. Stelmack et al., "Phosphatidylinositol-3 kinase/mammalian target of rapamycin/p70 S6K regulates contractile protein accumulation in airway myocyte differentiation," *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, vol. 31, no. 3, pp. 266–275, 2004.
- [238] A. M. Goldsmith, J. K. Bentley, L. Zhou et al., "Transforming growth factor- β induces airway smooth muscle hypertrophy," *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, vol. 34, no. 2, pp. 247–254, 2006.
- [239] J. S. Mohamed, M. A. Lopez, and A. M. Boriek, "Mechanical stretch up-regulates microRNA-26a and induces human airway smooth muscle hypertrophy by suppressing glycogen synthase kinase-3 γ ," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 285, no. 38, pp. 29336–29347, 2010.
- [240] M. Meyer, W. Schillinger, B. Pieske et al., "Alterations of sarcoplasmic reticulum proteins in failing human dilated cardiomyopathy," *Circulation*, vol. 92, no. 4, pp. 778–784, 1995.
- [241] J. K. Bentley and M. B. Hershenon, "Airway smooth muscle growth in asthma: proliferation, hypertrophy, and migration," *Proceedings of the American Thoracic Society*, vol. 5, no. 1, pp. 89–96, 2008.
- [242] L. Zhou, A. M. Goldsmith, J. K. Bentley et al., "4E-binding protein phosphorylation and eukaryotic initiation factor-4E release are required for airway smooth muscle hypertrophy," *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, vol. 33, no. 2, pp. 195–202, 2005.
- [243] H. Deng, M. B. Hershenon, J. Lei et al., "p70 ribosomal S6 kinase is required for airway smooth muscle cell size enlargement but not increased contractile protein expression," *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, vol. 42, no. 6, pp. 744–752, 2010.
- [244] H. Deng, G. A. Dokshin, J. Lei et al., "Inhibition of glycogen synthase kinase-3 β is sufficient for airway smooth muscle hypertrophy," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 283, no. 15, pp. 10198–10207, 2008.
- [245] A. Laitinen, A. Altraja, M. Kampe, M. Linden, I. Virtanen, and L. A. Laitinen, "Tenascin is increased in airway basement membrane of asthmatics and decreased by an inhaled steroid," *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 156, no. 3, part 1, pp. 951–958, 1997.
- [246] C. R. Roberts, "Remodelling of the extracellular matrix in asthma: proteoglycan synthesis and degradation," *Canadian Respiratory Journal*, vol. 5, no. 1, pp. 48–50, 1998.
- [247] J. Bousquet, P. Chané, J. Y. Lacoste et al., "Asthma: a disease remodeling the airways," *Allergy*, vol. 47, no. 1, pp. 3–11, 1992.
- [248] A. Torrego, M. Hew, T. Oates, M. Sukkar, and F. C. Kian, "Expression and activation of TGF- β isoforms in acute allergen-induced remodelling in asthma," *Thorax*, vol. 62, no. 4, pp. 307–313, 2007.
- [249] P. Flood-Page, A. Menzies-Gow, S. Phipps et al., "Anti-IL-5 treatment reduces deposition of ECM proteins in the bronchial subepithelial basement membrane of mild atopic asthmatics," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 112, no. 7, pp. 1029–1036, 2003.
- [250] L. A. Laitinen, A. Laitinen, A. Altraja et al., "Bronchial biopsy findings in intermittent or 'early' asthma," *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 98, no. 5, part 2, pp. S33–S40, 1996.
- [251] S. Gabbriellini, S. Di Lollo, N. Stanflin, and P. Romagnoli, "Myofibroblast and elastic and collagen fiber hyperplasia in the bronchial mucosa: a possible basis for the progressive irreversibility of airway obstruction in chronic asthma," *Pathologica*, vol. 86, no. 2, pp. 157–160, 1994.
- [252] T. R. Bai, J. Cooper, T. Koelmeyer, P. D. Pare, and T. D. Weir, "The effect of age and duration of disease on airway structure in fatal asthma," *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 162, no. 2, part 1, pp. 663–669, 2000.
- [253] P. R. Johnson, J. K. Burgess, P. A. Underwood et al., "Extracellular matrix proteins modulate asthmatic airway smooth muscle cell proliferation via an autocrine mechanism," *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 113, no. 4, pp. 690–696, 2004.
- [254] J. K. Burgess, C. Ceresa, S. R. Johnson et al., "Tissue and matrix influences on airway smooth muscle function," *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics*, vol. 22, no. 5, pp. 379–387, 2009.
- [255] S. J. Hirst, C. H. Twort, and T. H. Lee, "Differential effects of extracellular matrix proteins on human airway smooth muscle cell proliferation and phenotype," *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, vol. 23, no. 3, pp. 335–344, 2000.
- [256] Q. Peng, D. Lai, T. T. Nguyen, V. Chan, T. Matsuda, and S. J. Hirst, "Multiple β 1 integrins mediate enhancement of human airway smooth muscle cytokine secretion by fibronectin and type I collagen," *Journal of Immunology*, vol. 174, no. 4, pp. 2258–2264, 2005.

- [257] T. Tran, K. D. McNeill, W. T. Gerthoffer, H. Unruh, and A. J. Halayko, "Endogenous laminin is required for human airway smooth muscle cell maturation," *Respiratory Research*, vol. 7, article 117, 2006.
- [258] M. Lederlin, A. Ozier, M. Montaudon et al., "Airway remodeling in a mouse asthma model assessed by in-vivo respiratory-gated micro-computed tomography," *European Radiology*, vol. 20, no. 1, pp. 128–137, 2010.

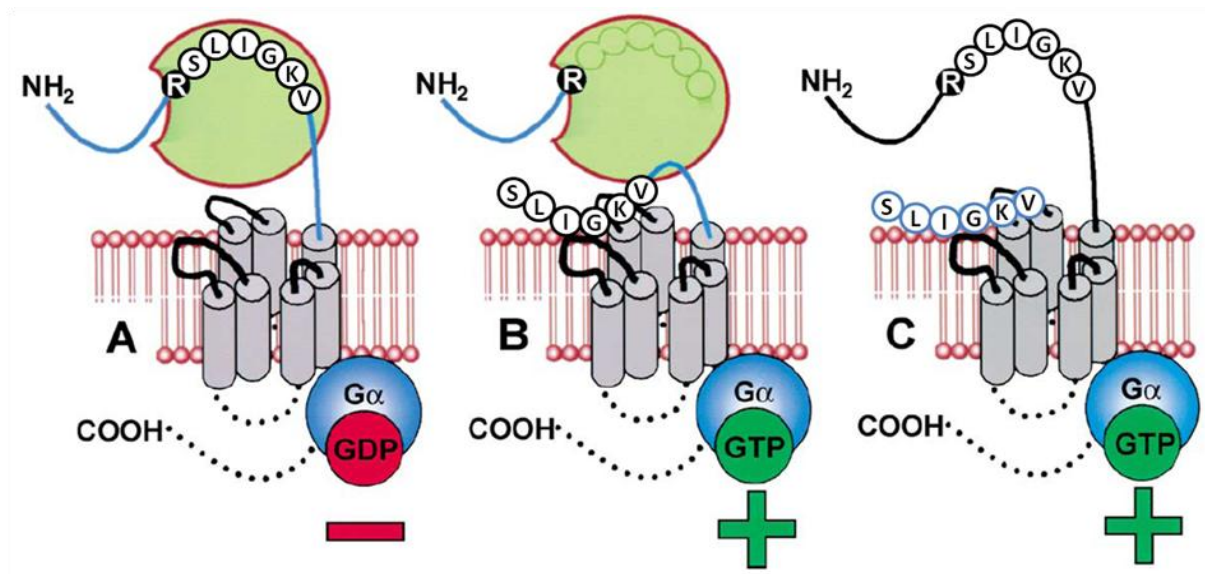
I – C – Les récepteurs activés par les protéases (PARs) des voies aériennes

I – C – 1 – Généralités

Les récepteurs PARs (Protease-Activated Receptors) sont des récepteurs à 7 domaines transmembranaires, couplés aux protéines G (RCPG). L'activation de ces récepteurs se fait après un clivage protéasique, spécifique d'une séquence extracellulaire N-terminale. La séquence nouvellement formée en N-terminale peut ainsi se fixer sur la 2^{ème} boucle extracellulaire du récepteur et déclencher l'activation des protéines G (Figure 10).

Les PARs forment une famille de 4 récepteurs, nommés selon l'ordre chronologique de leur découverte : PAR-1, PAR-2, PAR-3 et PAR-4. Ces récepteurs sont exprimés dans de nombreux tissus de l'organisme. Ils sont impliqués dans les mécanismes physiologiques et physiopathologiques des systèmes cardiovasculaires, nerveux, gastro-intestinaux, cutanés et respiratoires. Cette partie se concentrera uniquement sur les PARs exprimés au niveau des voies aériennes (cf [167 , 168 , 169 , 170 , 171 , 172 , 173 , 174 , 175] pour une lecture complète sur les PARs).

Figure 10 : Schématisation de la structure et de l'activation d'un récepteur PAR.



Légende : Exemple d'activation du récepteur PAR-2 par la tryptase. A : Fixation de la tryptase sur une séquence extracellulaire N-terminale, et clivage au niveau du site ...R³⁴↑SLIGKV... . B : La séquence SLIGKV nouvellement formée, interagit avec la 2^{ème} boucle extracellulaire du récepteur, induisant une transduction du signal par l'activation des protéines G. C : Activation du récepteur PAR-2 avec le peptide synthétique SLIGKV, sans clivage protéasique. (Schéma adapté de R.S. Lan et al. *Pharmacology & Therapeutics* 95 (2002) 239-257)

I – C – 1 – a. Activation et localisation des PARs au niveau des voies aériennes

Initialement décrits dans les processus de coagulation et d'activation plaquettaire pour leur rôle dans la cicatrisation, les PARs sont aujourd'hui impliqués dans d'autres mécanismes physiologiques et physiopathologiques. Les PARs sont des censeurs, ou des sentinelles de l'environnement protéolytique extracellulaire. Classiquement, les PARs 1, 3 et 4 sont activés par la thrombine et le PAR-2 par la trypsine. La thrombine et la trypsine sont les principales protéases endogènes, mais d'autres protéases exogènes et endogènes sont capables d'activer/inactiver les récepteurs PARs (Tableau 6 et 7).

Les effets de ces protéases, ou ligands spécifiques, sont détaillés ci-dessous pour chaque PAR, en précisant le modèle des voies aériennes étudié : *in vivo* (Tableau 8), en organe isolé (Tableau 9), *in vitro* sur des cellules épithéliales (Tableau 10), des cellules musculaires lisses (Tableau 11) et des fibroblastes (Tableau 12).

Tableau 6 : Protéases exogènes activatrices / inactivatrices des PARs

PAR-1	PAR-2	PAR-4
(+) Gingipains-R	(+) Gingipains-R	(+) Gingipains-R
(-) Der p 1	(+) Der p 1, 3, 9	
(+) Pen c 13	(+) <i>German Cockroach</i>	
	(+) <i>Alternaria alternata</i>	
	(+) <i>Cladosporium herbarum</i>	
	(+) <i>Aspergillus fumigatus</i>	
	(+) Chitinase de <i>Streptomyces griseus</i>	
	(+) Thermolysine	
	(-) Epa	
	(+) Pen c 13	

(+) = activatrice ; (-) = inactivatrice ; Der p 1, 3, 9 = cystéine protéase (1) et sérines protéases (3 et 9) de *Dermatophagoides pteronyssinus* ; Epa = elastolytic metalloproteinase de *Pseudomonas aeruginosa* ; German Cockroach = protéases de *Blattella germanica* ; Gingipains-R = Arg-Gingipains (cystéine protéase de *Porphyromonas gingivalis*) ; Pen c 13 = sérine protéase de *Penicillium citrinum* ; Thermolysine = métalloprotéase de *Bacillus thermoproteolyticus*

Tableau 7 : Protéases endogènes et peptides activateurs / inactivateurs des PARs

Propriétés	PAR-1	PAR-2	PAR-3	PAR-4
Enzyme sélective activatrice	Thrombine	Trypsine	Thrombine	Thrombine Trypsine
Autres enzymes	(+,-) Trypsine (+) Tryptase (+) Granzyme A (+) FVIIa, FXa et TF (-) Cathepsine G (-) Protéinase 3 (-) Elastase (-) Chymase (+,-) Plasmine (+) APC	(+) Tryptase (+) HAT (+) FVIIa, FXa et TF (+) "ligant lié" de PAR-1 (+, -) Cathepsine G (+, -) Protéinase 3 (+, -) Elastase (+) MT-SP1 (-) Plasmine (-) Chymase (+) Kallicréine (+) TMPRSS2 (+) Acrosine (+) YKL-40	(+) Trypsine (+) FXa (-) Cathepsine G (-) Elastase	(+) Cathepsine G (+) FVIIa, Fxa
"ligants liés"	SFLLRN (h) SFLLRN (r,m) TFRIFD (x)	SLIGKV (h) SLIGRL (r,m)	TFRGAP (h) (inactif) SFNGCP (m) (inactif)	GYPGQV (h) GYPGKF (m)
Peptides agonistes (synthétiques)	TFLLR-NH ₂ TFRIFD SFLLRN-NH ₂	SLIGKV-NH ₂ SLIGRL-NH ₂ trans-cinnamoyl-LIGRLO-NH ₂ 2-Furoyl-LIGRLO	—	GYPGKF-NH ₂ GYPGQV-NH ₂ AYPGKF-NH ₂
Peptides antagonistes (synthétiques)	Mercaptopropionyl-F-Cha-RKPNDK-NH ₂ Trans-cinnamoyl-parafluoro-F-paraguanidino-FLRR-NH ₂	FSLLRY	—	trans-cinnamoyl-YPGKF-NH ₂

(+) = activatrice ; (-) = inactivatrice ; APC = Activated Protein C ; FVIIa = Coagulation factor VIIa ou Proconvertine ; FXa = Coagulation factor Xa ; HAT = Human airway trypsin-like protease ; MT-SP1 = Membrane Type Serine Protease 1 ou matryptase ; TF = Tissue Factor ; TMPRSS2 = Transmembrane protease serine 2 ; YKL-40 = chitinase 3-like 1 protein

PAR-1

Les récepteurs PAR-1 sont exprimés par les cellules épithéliales bronchiques primaires [176], l'épithélium nasal [177] mais aussi par diverses lignées épithéliales (Tableau 10). On les retrouve aussi au niveau des CML bronchiques (Tableau 11) et des fibroblastes (Tableau 12).

Dans les modèles *in vivo*, l'activation du PAR-1, chez le cochon d'Inde, induit une bronchoconstriction [178] et dans un modèle de souris infecté par le virus Influenza A, l'expression du PAR-1 épithéliale est augmentée [179].

Sur des organes isolés, l'activation du PAR-1 semble induire des effets contradictoires. D'une part, on observe une relaxation des trachées et des bronches par un mécanisme cyclo-oxygénase (COX) dépendant [180 , 181 , 182 , 183 , 184]. D'autre part, une contraction est décrite sur des bandes parenchymateuses de cochon d'Inde [185] et sur des anneaux bronchiques humains [186].

L'activation *in vitro* du PAR-1 épithélial induit la production de PDGF (platelet-derived growth factor), d'IL-6, d'IL-8 et de PGE2 (prostaglandine E2) (Tableau 10).

L'activation *in vitro* du PAR-1 musculaire lisse induit la prolifération cellulaire (Tableau 11). Le même effet est observé sur des fibroblastes (Tableau 12), avec en plus la production de procollagène et de CTGF (Connective Tissue Growth Factor).

PAR-2

Le PAR-2 est exprimé par les épithéliums et muscles lisses de trachées et de bronches, son expression est visible à partir de l'embryon de 17 jours chez la souris [187]. On retrouve aussi le PAR-2 au niveau de l'épithélium nasal, où son expression est augmentée chez l'asthmatique [177]. Knight et al. ont aussi mis en évidence en 2001 une augmentation du PAR-2 au niveau de l'épithélium bronchique d'asthmatique [176]. L'expression du PAR-2 est aussi retrouvée au niveau du muscle lisse et des glandes bronchiques, de l'endothélium et du muscle lisse des vaisseaux bronchiques, mais aussi dans beaucoup d'autres tissus de l'organisme [188 , 189 , 190].

Les effets de l'activation du PAR-2 dans les voies aériennes sont détaillés dans la partie I-C-2.

PAR-3 et PAR-4

Tout comme les PAR-1 et -2, les PAR-3 et -4 sont exprimés au niveau de l'épithélium nasal, et l'expression de PAR-3 est aussi augmentée chez l'asthmatique [177]. Les PAR-3 et -4 ont aussi été détectés au niveau de l'épithélium et du muscle lisse bronchique [176].

Aucune étude ne montre l'effet de l'activation des PAR-3 et -4 *in vivo*. En revanche, des études chez le rongeur montrent une relaxation des trachées après activation du PAR-4 par son peptide agoniste [181 , 182 , 183].

L'activation des PAR-3 et -4 *in vitro* est peu documentée. La stimulation des PAR-4 épithéliaux par un peptide agoniste induit la production des cytokines IL-6 et IL-8 ainsi que la production de PGE2 [191].

Tableau 8 : Effets *in vivo* des PARs dans les voies aériennes

PARs	Modèles	Effets	Références
PAR-1	C (Thrombine i.v., TRAP-9 i.v.)	bronchoconstriction	[178]
PAR-2	C (trypsine, SLIGRL-NH2 i.t. et i.v.)	bronchoconstriction	[192]
PAR-2	C (SLIGRL i.v.)	protège de la bronchoconstriction induite par l'histamine	[193]
PAR-2	L (30 jrs, Par j 1 (<i>Parietaria judaica</i>), SLIGRL aérosol)	inhibe la bronchoconstriction et l'HRB et diminue l'inflammation	[194]
PAR-2	S (extraits d' <i>Alternaria alternata</i>)	inflammation pulmonaire	[195]
PAR-2	S (BALB/c OVA 30 jrs, SLIGRL i.n.)	diminue l'éosinophilie et l'HRB, relaxation (PGE2)	[196]
PAR-1-2-3-4	S (infection Influenza A virus)	augmentation de l'expression de PAR-1 et PAR-2 dans l'épithélium	[179]
	SLIGRL-NH2 (i.v.)	inhibe transitoirement la bronchoconstriction induite par la métacholine	

C = cochon d'Inde ; HRB = hyperréactivité bronchique ; L = lapin ; PGE2 = prostaglandine E2 ; S = souris ; TRAP-9 = thrombin receptor activating peptide

Tableau 9 : Effets *in vitro* des PARs dans les voies aériennes en organes isolés

PARs	Modèles	Effets	Références
PAR-1-2	H (anneaux bronchiques, bronches, thrombine, trypsine, SLIGKV-NH2)	contraction	[186], [197], [189]
	H (bronches sans épithélium)	augmente la contraction	[189]
PAR-1-2	C (bandes parenchymateuses, peptides agonistes)	contraction	[185]
PAR-1-2	C, R, S, H (bronches, thrombine, trypsine, SFLLRN-NH2, SLIGRL-NH2)	relaxation (COX)	[180]
PAR-1-2-4	S, R (trachées, bronches, thrombine, trypsine, SFLLRN-NH2, SLIGRL-NH2, GYPGKF-NH2)	relaxation (COX, PGE2) anti-inflammatoire	[181], [182], [183], [198], [184]
PAR-2	C (trachée et bronche principale, trypsine, SLIGRL-NH2)	relaxation	[192]
	C (bronche principale sans épithélium)	contraction	
PAR-2	R (LPS i.v. 20h, bronche, SLIGRL)	relaxation (PGE2) (diminuer si pas d'épithélium)	[199]
PAR-2	H (glandes sous-muqueuses, SLIGRL-NH2)	production de mucus	[200]
PAR-2	H (glandes sous-muqueuses nasales, HDM)	augmente le taux de sécrétion	[201]
PAR-2	H (bronches, tryptase)	augmentation de l'hyperréactivité	[85]

C = cochon d'Inde ; COX = cyclo-oxygénase ; H = humain ; HDM = house dust mite ; PGE2 = prostaglandine E2 ; R = rat ; S = souris

Tableau 10 : Effets *in vitro* des PARs épithéliaux dans les voies aériennes

PARs	Modèles	Effets	Références
PAR-1	H (A549, BEAS-2B, primaire, thrombine)	production de PDGF	[202]
PAR-1-2-3	H (Calu-3, neutrophile élastase)	via PAR-2, production de MUC5AC, augmentation [Ca ²⁺] _i , PKC	[203]
PAR-1-2-4	H (A549, BEAS-2B, HeLa, primaire, Der p 1, thrombine, trypsine, peptides agonistes)	production d'IL-6, d'IL-8 et de PGE2 (plus importante pour PAR-2)	[204], [191]
PAR-2	C (trypsine, SLIGRL-NH2)	augmentation [Ca ²⁺] _i	[205]
PAR-2	H (A549, BEAS-2B, HBE, 16HBE14o-, primaire, HAT, SLIGKV-NH2, <i>German Cockroach</i> protéases, thermolysine, extrait d' <i>Alternaria</i> , SLIGRL-NH2)	augmentation [Ca ²⁺] _i	[206], [207], [208], [195]
PAR-2	H (HBE, extraits d' <i>Alternaria</i>)	augmentation [Ca ²⁺] _i , relargage ATP (plus chez l'asthmatique)	[209]
PAR-2	H (BEAS-2B, Calu-3, A549, Der p 3, Der p 9, SLIGKV et extrait d' <i>Alternaria</i>)	augmentation [Ca ²⁺] _i , production de GM-CSF, IL-6, IL-8 et éotaxine	[210], [211]
PAR-2	H (9HTEo, 16HBE14o, CFDE, trypsine, SLIGRL-NH2)	changements du transport d'ions (absorption devient sécrétion)	[212]
PAR-2	H (HBEC, trypsine, SLIGRL-NH2)	inhibe le transport d'ions	[213]
PAR-2	H (H292, tryptase)	prolifération, production d'IL-8, expression ICAM-1	[91]
PAR-2	H (A549, SLIGRL-NH2)	production de PGE2 (+ avec LPS, - avec dexaméthasone)	[184]
PAR-2	H (A549, primaire, trypsine, transcinnamoyl-LIGRLO-NH2, SLIGRL-NH2)	production de MMP-9, GM-CSF, éotaxine	[214], [215]
PAR-2	H (BEAS-2B, extraits d' <i>Alternaria</i> , trypsine, papaine)	production de TSLP	[216]
PAR-2	H (A549, primaire, protéases d' <i>Alternaria alternata</i> , <i>Cladosporium herbarum</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i>)	production d'IL-6, d'IL-8 et changements morphologiques (desquamation)	[217]
PAR-2	H (16HBE14o, <i>German Cockroach</i> protéases, SLIGKV, TFRIFD, TNF-α)	production d'IL-8 (activation ERK), augmentation de l'activité de NF-IL-6	[218], [219]
PAR-2	H (A549, 16HBE, élastase, cathepsin G, Epa)	"désarme" PAR-2 (toujours sensible aux peptides agonistes)	[220], [221]
PAR-2	H (NCI-H292, HBE-1, primaire, SLIGKV-NH2, HAT)	sécrétion de mucine, augmentation ARNm des mucines (voie AR-EGFR)	[222], [223]

AR-EGFR = amphiregulin-epidermal growth factor receptor ; C = cochon d'Inde ; Der p 1, 3, 9 = cystéine protéase (1) et sérines protéases (3 et 9) de *Dermatophagoides pteronyssinus* ; Epa = élastolytique métalloprotéase de *Pseudomonas aeruginosa* ; GM-CSF = granulocyte-macrophage colony-stimulating factor ; H = humain ; HAT = human airway trypsin-like protease ; ICAM-1 = intercellular adhesion molecule 1 ; LPS = lipopolysaccharide ; MMP-9 = matrix métalloprotéase 9 ; MUC5AC = mucine-5AC ; NF-IL-6 = nuclear factor for IL-6 expression ; PDGF = platelet-derived growth factor ; PKC = protéine kinase C ; PGE2 = prostaglandine E2 ; TSLP = thymic stromal lymphopoietin

Tableau 11 : Effets *in vitro* des PARs musculaires lisses dans les voies aériennes

PARs	Modèles	Effets	Références
PAR-1	B (CML de trachées, thrombine, PDGF-BB)	prolifération (activation PLC)	[224], [225]
PAR-1	H (thrombine, EGF)	prolifération (PI3K) et production de GM-CSF (indépendant de PAR-1)	[226], [227]
PAR-2	D, H (CML de trachées, tryptase, tryptase inactivée)	prolifération (pas uniquement par PAR-2)	[228], [229]
PAR-2	H (thrombine, trypsine, SLIGKV-NH ₂ , tryptase)	augmentation synthèse d'ADN et augmentation [Ca ²⁺] _i	[197], [189]
PAR-2	H (trypsine, serait indépendant de PAR-2)	production de PGE ₂ (plus faible chez l'asthmatique)	[230]
PAR-2	H (tryptase, SLIGKV-NH ₂)	production de TGF-β migration de mastocytes	[77]
PAR-2	H (tryptase, SLIGKV-NH ₂)	prolifération et augmentation [Ca ²⁺] _i	[93], [86]
PAR-2	H (YKL-40)	prolifération et migration (plus chez l'A)	[131]
PAR-2	H (IL-1β)	augmente l'expression de PAR-2	[231]
PAR-2	H (IL-1β)	production de GM-CSF (augmentée avec histamine ou tryptase)	[232]
PAR-2	H (extraits d'HDM)	augmentation d'IL-6 et prolifération (chez les asthmatiques) diminution de CEBPα et augmentation de calréticuline	[233]

B = bovin ; CEBPα = CCAAT/enhancer binding protein alpha ; D = chien ; GM-CSF = granulocyte-macrophage colony-stimulating factor ; H = humain ; HDM = house dust mite ; PGE₂ = prostaglandine E₂ ; PI3K = phosphatidylinositol 3-kinase ; YKL-40 = chitinase 3-like 1 protein ; TGF-β = transforming growth factor beta

Tableau 12 : Effets *in vitro* des PARs de fibroblastes dans les voies aériennes

PARs	Modèles	Effets	Références
PAR-1	S, HC (thrombine)	prolifération (MAPK), activation Src	[234], [235]
PAR-1	H (thrombine)	production de procollagène et CTGF	[236], [237]
PAR-2	H, HC, R (tryptase)	prolifération	[94], [238]
PAR-2	H (HAT)	prolifération, augmentation [Ca ²⁺] _i , MAPK	[239]

CTGF = connective tissue growth factor ; H = humain ; HAT = human airway trypsin-like protease ; HC = hamster chinois ; MAPK = mitogen-activated protein kinase ; R = rat ; S = souris ; Src = Src family kinase

En plus des cellules structurales, certaines cellules du système immunitaire qui infiltrent les poumons expriment aussi des PARs. Ainsi les mastocytes, les macrophages alvéolaires et les lymphocytes expriment les PAR-1 et -2. Les éosinophiles, les monocytes et les cellules dendritiques expriment les PAR-1-2 et -3. Les neutrophiles expriment uniquement le PAR-2 [170].

I – C – 1 – b. Signalisation des PARs

Deux voies de signalisation entrent en jeu après l'activation des PARs. Une première voie d'activation liée aux protéines G (Guanine nucleotide-binding proteins) et une seconde voie, impliquant les β -arrestines, entraînant la désensibilisation et le recyclage du récepteur.

Signalisation dépendante des protéines G

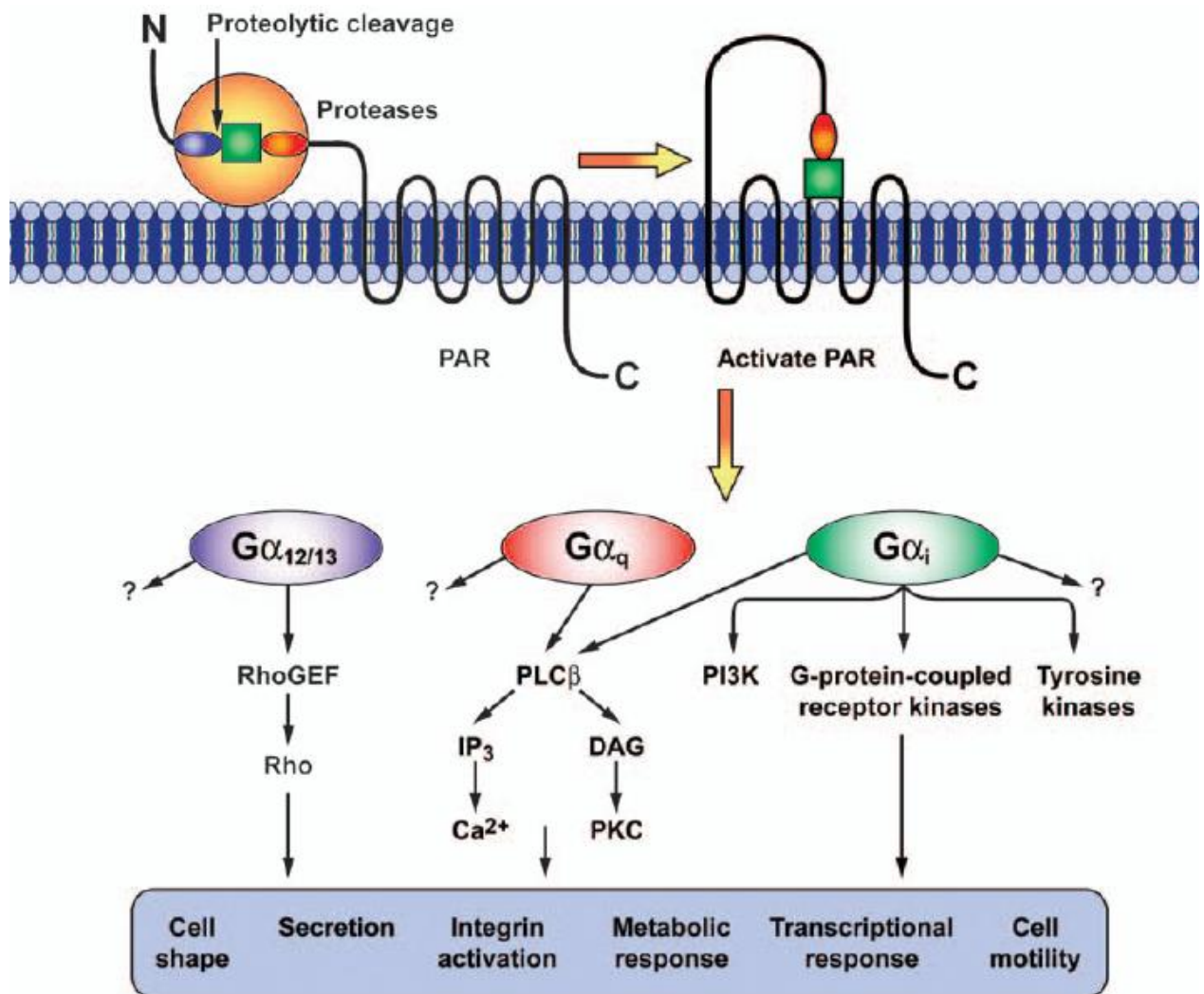
Parmi les protéines G, les sous-unités $\alpha_{q/11}$, α_i et $\alpha_{12/13}$ sont recrutées au niveau de la partie C-terminale du PAR (Figure 11) [173].

L'activation des protéines G $\alpha_{12/13}$ stimule la voie RhoA (Rho-GEF, RhoA, RhoA kinase, LIM kinase, cofilines) aboutissant à une réorganisation du cytosquelette d'actine et à la contraction des CML [240].

L'activation des protéines G $\alpha_{q/11}$ stimule la voie des phospholipides membranaires (phospholipase $C\beta$, inositol triphosphate, augmentation du Ca^{2+} intra-cellulaire, plus diacylglycerol, activation de la protéine kinase C), aboutissant principalement à la contraction de la cellule.

L'activation des protéines G α_i inhibe l'AC (adénylate cyclase), active la PI3K (Phosphoinositide 3-kinase), la voie ERK (Extracellular signal-regulated kinases) des MAPs kinases, et la transcription de gènes spécifiques impliqués dans la synthèse protéique ou la prolifération cellulaire [241].

Figure 11 : Signalisation cellulaire du PAR impliquant les protéines G.

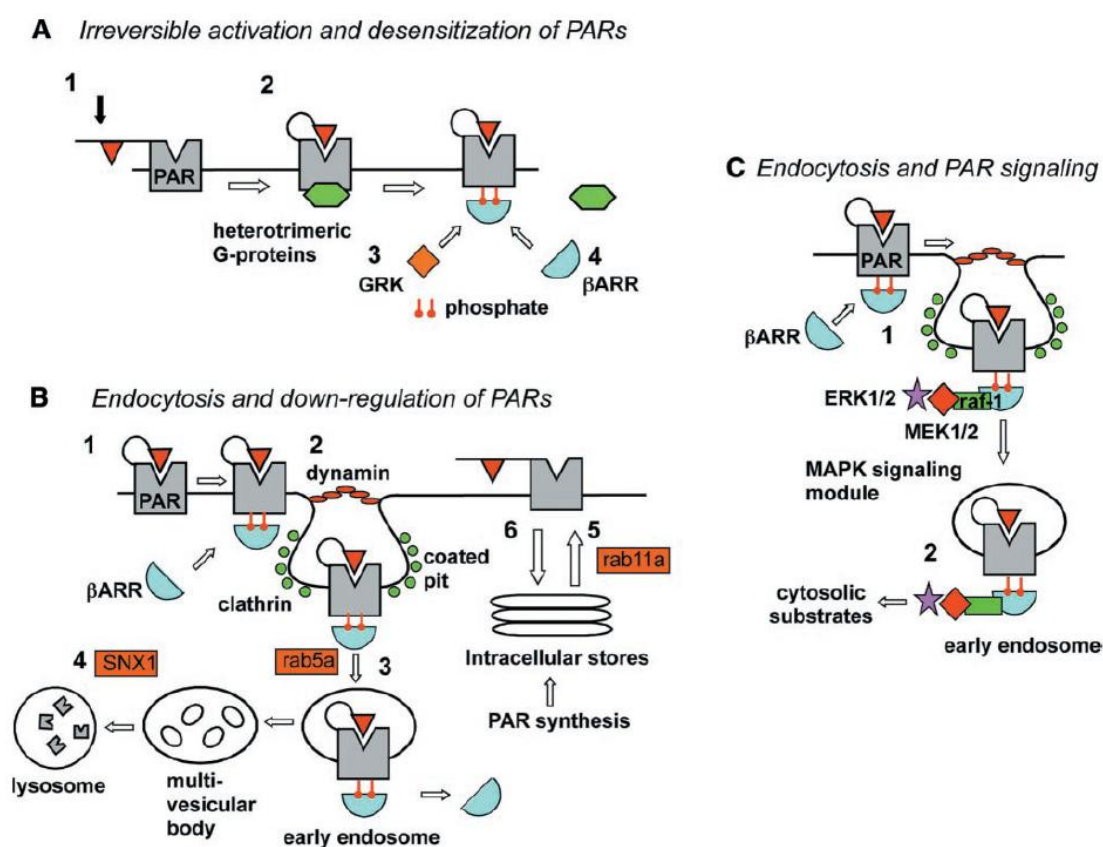


Légende : RhoGEF : Rho guanine nucleotide exchange factor, PLC β : phospholipase C β , PI3K : phosphoinositide 3-kinase, IP $_3$: inositol triphosphate, DAG : diacylglycerol, PKC : protein kinase C. (*Reproduit de Reed et Kita JACI 2004*)

Signalisation des β -arrestines et trafic cellulaire des PARs

Cette voie permet principalement d'éteindre le signal d'activation des PARs. L'essentiel de ces processus est repris dans la figure 12. La signalisation des β -arrestines est aussi capable d'inhiber certaines voies activées par les protéines G, telles que CAMKK β /AMPK et PI3K (p85/p110) [172].

Figure 12 : Désensibilisation, régulation et trafic vésiculaire des PARs.



Légende : A : Le clivage du récepteur active le PAR, couplé aux protéines G hétérotrimériques. L'activation induit la translocation à la membrane des GRKs (G protein-coupled receptor kinase), qui phosphorylent le PAR, permettant la translocation membranaire des β -arrestines et leurs interactions entraînant le découplage et la désensibilisation. B : Le clivage du récepteur et l'interaction avec les β -arrestines induit une endocytose dépendante des dynamines et clathrines. Le trafic des endosomes précoces est médié par rab5a. Le PAR est ensuite dirigé vers les lysosomes par un mécanisme impliquant des SNX (sorting nexin). La resensibilisation requiert la mobilisation d'un pool intracellulaire de PARs. Ce pool est alimenté par la synthèse de nouveaux PARs ou par endocytose constitutive de récepteurs non activés. C : Dans le cas de PAR-2, l'activation induit le recrutement de β -arrestines qui servent d'échafaudage moléculaire pour recruter et organiser les composants de la voie des MAPK qui recouvrent les puits ou les endosomes précoces. Les β -arrestines interagissent avec PAR-2, raf-1, MEK1/2 et ERK1/2 activés. (Reproduit de Ossovskaya et al. *Physiol Rev* 2004)

I – C – 2 – Physiologie du PAR-2 des voies aériennes et implication dans l'asthme

Au cours de ces travaux de thèse, nous avons choisi de nous concentrer uniquement sur le PAR-2 pour 3 raisons : (i) le nombre d'activateurs identifiés pour le PAR-2 est plus important que pour les autres récepteurs et ces activateurs sont impliqués dans la physiopathologie de l'asthme ; (ii) le PAR-2 est augmenté dans l'épithélium bronchique des asthmatiques, mais son niveau d'expression est à préciser au niveau du muscle lisse bronchique ; (iii) la majorité des études sur le PAR-2 a été menée sur des cellules obtenues à partir de sujets témoins. La comparaison avec des cellules d'asthmatiques est nécessaire. Parmi les études citées ci-dessous, seules les 3 études soulignées utilisent des cellules d'asthmatiques.

Le PAR-2 a fait l'objet de plusieurs études importantes dans la physiopathologie de l'asthme. La publication de Knight et al. [176] montre que l'expression du PAR-2 est augmentée au niveau de l'épithélium bronchique des patients asthmatiques. Bien que l'augmentation du PAR-2 sur le muscle lisse bronchique n'ait pas été observée dans cette étude, des facteurs inflammatoires, tels que l'IL-1 β , permettent d'augmenter l'expression du PAR-2 des CML bronchiques *in vitro* [231]. Par ailleurs, les mastocytes sont capables d'infiltrer le muscle lisse bronchique de l'asthmatique [242]. Les mastocytes activés libèrent de la tryptase, qui va activer le PAR-2 des CML. Plusieurs études se sont intéressées aux conséquences de cette activation de la CML bronchique (Tableau 12). Brièvement, on observe *in vitro* une augmentation de la concentration calcique intra-cellulaire [86], une augmentation de la prolifération [93] et de l'hyperréactivité bronchique [85] ainsi qu'une production de TGF- β 1 permettant le recrutement de nouveaux mastocytes [77].

D'autres protéases libérées à proximité du muscle lisse bronchique sont capables d'activer le PAR-2. Notamment YKL-40, une chitinase-like protéine produite par

l'épithélium, qui est augmentée chez les asthmatiques sévères [132, 243]. La stimulation des CML par YKL-40 induit une prolifération et une migration des cellules *in vitro*, et la migration est plus importante lorsque les CML bronchiques sont issues de patients asthmatiques [131].

Les effets de l'activation du PAR-2 sur l'obstruction des voies aériennes semblent contradictoires. En effet, la stimulation du PAR-2 de l'épithélium bronchique entraîne une broncho relaxation, par un mécanisme de production de PGE2 [180]. En revanche, la stimulation du PAR-2 des cellules musculaires lisses bronchiques entraîne une contraction [197]. D'ailleurs, la stimulation du PAR-2 d'une bronche isolée entraîne une contraction de la bronche et cette contraction augmente si l'on retire l'épithélium du tissu bronchique [189].

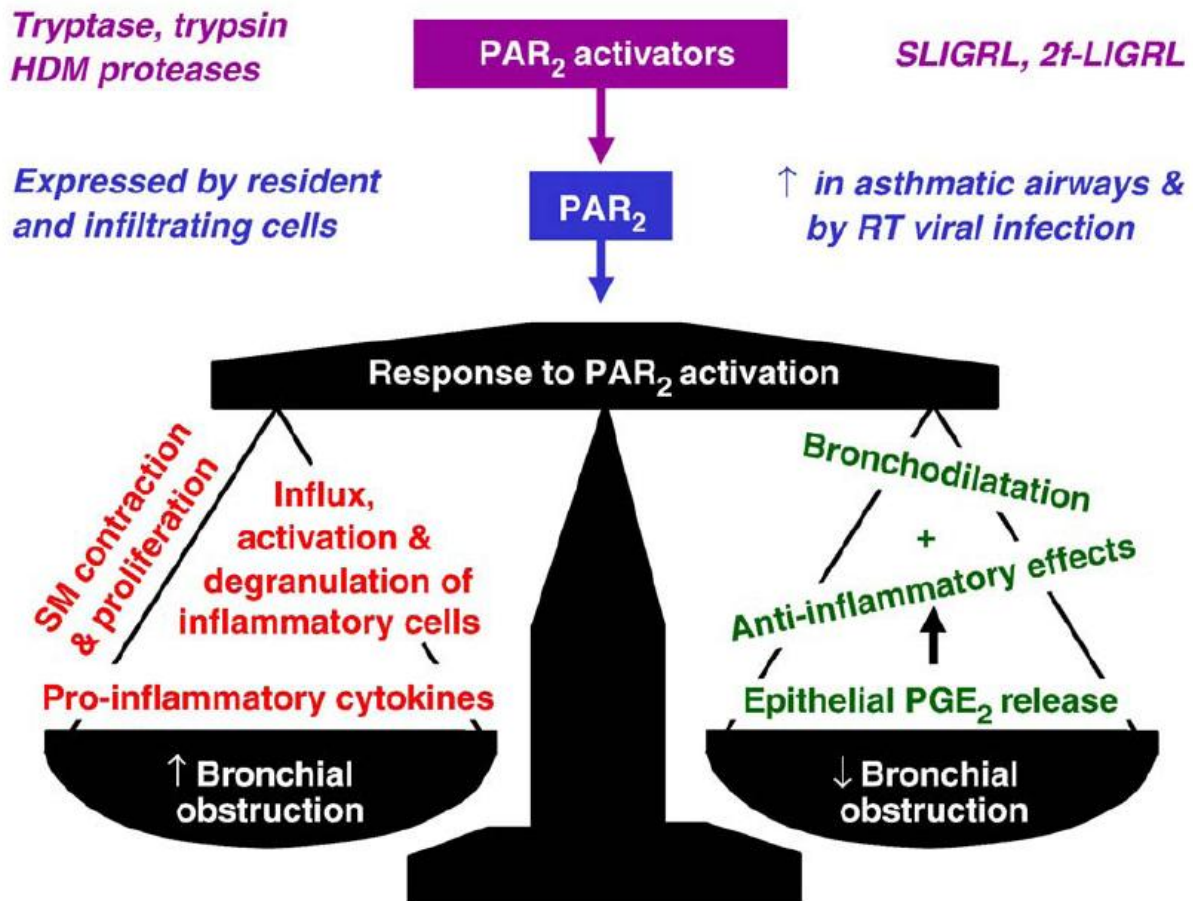
Un modèle de souris sensibilisées à l'ovalbumine illustre bien l'effet du PAR-2. Chez ces souris sensibilisées on observe une infiltration de leucocytes dans les lavages broncho alvéolaires et une hyperréactivité des voies aériennes à la métacholine. Comparée aux animaux contrôles, l'infiltration d'éosinophiles était inhibée de 73% chez les souris PAR-2^{-/-} et augmentée de 88% chez les souris surexprimant le PAR-2. De manière similaire, l'hyperréactivité à la métacholine était diminuée de 38% chez les souris PAR-2^{-/-} et augmentée de 52% chez les souris surexprimant PAR-2 [244]. Ainsi, l'activation du PAR-2 pourrait jouer un rôle pro-inflammatoire. Ebeling et al. ont montré que lorsque des souris sauvages, sensibilisées à l'ovalbumine, reçoivent par voie intra-nasale un peptide agoniste du PAR-2, la réponse inflammatoire est augmentée [245]. Récemment, il a été montré que cette migration des cellules inflammatoires est dépendante des β -arrestines [246]. Cependant des études montrent aussi un rôle protecteur du PAR-2. Comme décrit précédemment, l'activation du PAR-2 épithélial produit de la PGE2. La PGE2 a une action de relaxation musculaire lisse mais aussi une action anti-inflammatoire, en inhibant la migration et la dégranulation des

éosinophiles [174, 196]. Les effets bénéfiques de la PGE2 dans l'asthme sont discutés dans la revue de Peters [247].

Chez les patients asthmatiques, le PAR-2 est aussi augmenté dans l'épithélium nasal [177]. Bien que non décrits comme asthmatiques dans l'étude de Cho et al., les patients souffrant de rhinite allergique et/ou de rhinosinusite chronique, surexpriment le PAR-2 au niveau des glandes sous-muqueuses des cornets du nez. L'activation du PAR-2 de l'épithélium nasal, par les protéases exogènes telles que les cystéines protéases des acariens, déclenche une augmentation du taux de sécrétion nasale [201], et induit aussi la production de cytokines par l'épithélium [248]. L'expression du PAR-2 dans l'épithélium (premières barrière contre les pathogènes), et la production de cytokines après activation par des protéases (acariens, champignons parasites,...) suggère que le PAR-2 soit une composante de la réponse innée.

La figure 13 résume le rôle du PAR-2 dans la physiologie des voies aériennes. Le PAR-2 fait partie de ces protéines yin et yang, dont l'environnement influence le côté protecteur ou au contraire, le côté destructeur. Il semblerait qu'une activation aiguë des fonctions du PAR-2 soit une aide dans les processus physiologiques normaux alors que, en condition d'hyper-activation associée à l'inflammation, le PAR-2 soit délétère.

Figure 13 : Rôle du PAR-2 dans la physiologie des voies aériennes.



Légende : Le PAR-2 est largement exprimé dans les différents types de cellules résidentes ou infiltrant les voies aériennes, et le niveau d'expression du PAR-2 peut changer selon les pathologies. L'activation du PAR-2 par des protéases endogènes et exogènes, et par les peptides agonistes peut produire des effets complexes et souvent opposés dans les voies aériennes. Cette balance déterminera si les activateurs du PAR-2 favoriseront ou atténueront l'obstruction bronchique. (D'après Henry Eur J Pharmacol 2006)

CHAPITRE II :

Matériel et Méthodes

II – A – Culture des cellules musculaires lisses bronchiques humaines (CML)

II – A – 1. Obtention des CML

Les différentes expérimentations *in vitro* ont été réalisées à partir de prélèvements broncho-pulmonaires issus de 2 groupes de patients : i) des sujets ayant une fonction respiratoire normale, qu'ils soient fumeurs ou non, et ii) des asthmatiques, de différents stades de sévérité selon la classification GINA [2]. Le premier groupe de patients est utilisé à titre de groupe témoin par rapport au groupe des asthmatiques au cours des diverses expérimentations.

Les spécimens broncho-pulmonaires humains proviennent ainsi, pour les sujets témoins, de zones macroscopiquement saines de pièces opératoires de pneumonectomie ou de lobectomie, pratiquées le plus souvent pour carcinome bronchique primitif [86]. Quant aux patients asthmatiques, les prélèvements sont issus de biopsies bronchiques, par fibroscopie. Après recueil, les spécimens bronchiques sont placés dans un milieu de culture stérile (DMEM, Dulbecco's modified eagles medium, Invitrogen Illkirch, France) contenant 0,5 U/mL de pénicilline, 0,5 mg/mL de streptomycine et 0,25 µg/mL d'amphotéricine B (Invitrogen). Ils sont ensuite disséqués sous microscope binoculaire afin d'extraire les tissus non désirés, *i.e.* épithélium, chorion muqueux, tissus adipeux et pulmonaire. Chaque faisceau de muscle lisse est rincé avec ce même milieu et découpé en fragments de 2 à 3 mm² de surface. Les explants musculaires lisses sont déposés dans des plaques de culture à 6 puits et cultivés avec 2 mL de milieu DMEM, contenant les antibiotiques et antimycotique sus-cités, supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF, Invitrogen), 1% d'acides aminés non

essentiels (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) et 1mM de pyruvate de sodium (Sigma-Aldrich). Par ailleurs, le risque de contamination par les mycoplasmes est prévenu de façon systématique par l'adjonction au milieu de culture d'un antibiotique dérivé de la famille des quinolones (MRA, Mycoplasma removal agent, Illkirch Graffenstaden, France, MP Biomedicals), à la concentration de 0,5 µg/mL. Celui-ci a pour effet d'inhiber l'ADN gyrase des mycoplasmes, cette enzyme étant essentielle à la réplication de leur ADN. Les mycoplasmes sont en effet des bactéries ubiquitaires, appartenant à la classe des Mollicutes, dont on recense près d'une centaine d'espèces, susceptibles d'altérer le métabolisme cellulaire [249]. Ils peuvent être pathogènes, mais également commensaux, et notamment des voies aériennes. En culture cellulaire, les sources de contamination habituelles sont la flore orale humaine, le sérum ou l'explant lui-même.

Les plaques de culture sont alors placées dans un incubateur à 37°C, sous une atmosphère enrichie avec 5% de CO₂. Le milieu de culture est changé toutes les 48 à 72 h. L'état des cellules est apprécié quotidiennement sous microscope par la bonne croissance cellulaire et l'absence de contamination bactérienne ou fongique. L'aspect des CML est caractéristique par leur forme allongée et leur orientation, parallèles les unes aux autres, formant des faisceaux.

Après 8 à 10 semaines de culture, les cellules dont la confluence est supérieure à 80% sont rincées avec une solution salée de Hank's (HBSS, Hank's balanced salt solution, Invitrogen) et soumises à un 1^{er} passage grâce à une solution contenant 0,5 g/L de trypsine et 0,2 g/L d'acide éthylène-diamine-tétra-acétique (EDTA, Invitrogen), puis placées dans des flacons de culture de 75 cm² de surface. Après une à deux semaines de culture, lorsque la confluence est de nouveau supérieure à 80%, les cellules sont soumises à un 2^{ème} passage à la trypsine et réparties sur différents supports selon les expérimentations : plaques de culture (6, 24 ou 96 puits), flacons de culture de 25 ou 75 cm², ou lames de culture à 8 puits.

Seuls les passages 2 à 5 sont utilisés pour éviter la dédifférenciation des CML en fibroblastes ou en myofibroblastes. Par ailleurs, préalablement à toute expérimentation, les cellules sont rendues quiescentes par une incubation de 48h avec un milieu de culture non supplémenté en SVF, permettant la synchronisation des cellules.

II – A – 2. Immunophénotypage des CML

Préalablement à toute expérimentation, la pureté des populations cellulaires cultivées est vérifiée par immunocytochimie et cytométrie en flux.

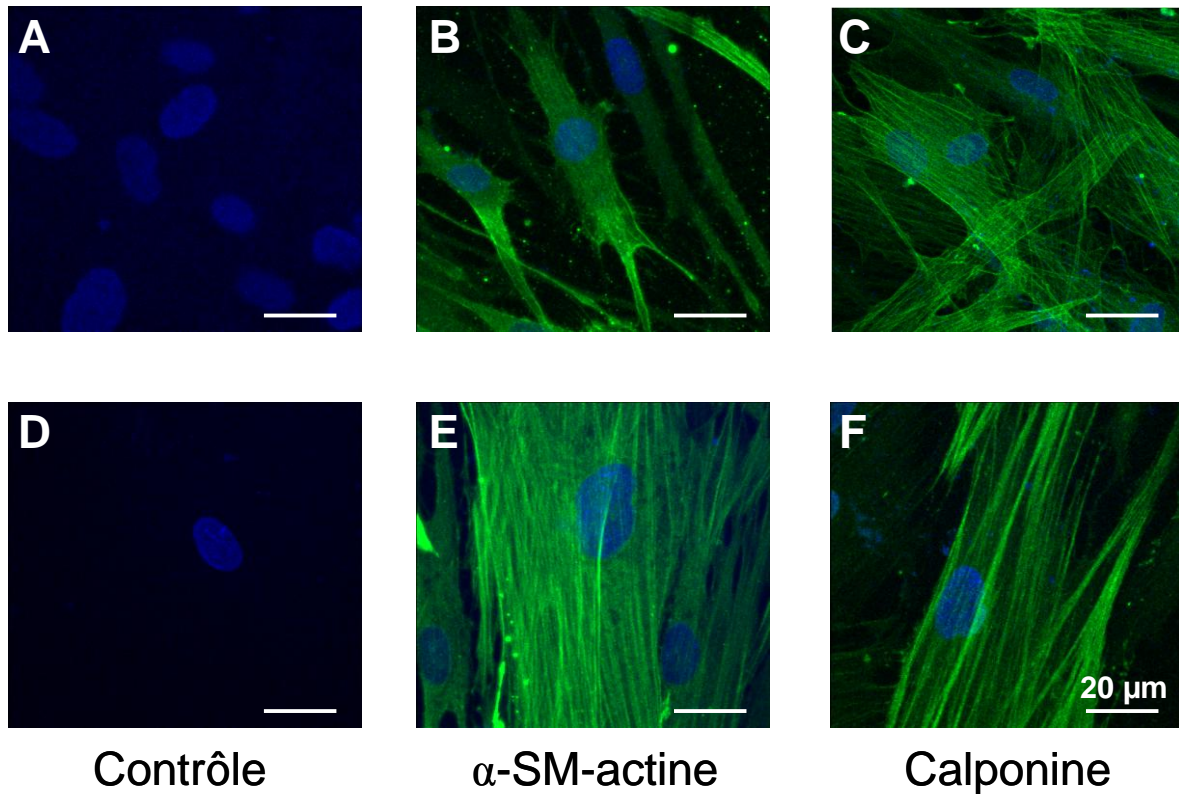
Immunocytochimie

Après rinçage avec un tampon phosphaté (PBS, Phosphate buffered saline, Invitrogen), les cellules sont fixées et perméabilisées avec du méthanol (Sigma-Aldrich) à 20°C pendant 20 minutes. La saturation des sites de fixation non spécifiques est réalisée par l'addition d'une solution d'albumine bovine sérique à 3% (BSA, Bovine serum albumin, Sigma-Aldrich) diluée dans du PBS, pendant 30 minutes, à température ambiante. Les anticorps primaires utilisés sont un anticorps monoclonal de souris anti- α -actine du muscle lisse humain (clone 1A4, Sigma-Aldrich) et un anticorps polyclonal de lapin anti-calponine du muscle lisse humain (clone FL-297, Santa Cruz, Nanterre, France). Ceux-ci sont dilués au 1/100^{ème} dans une solution de PBS-BSA à 1% et incubés pendant 1h à température ambiante. Des témoins négatifs sont réalisés avec un anticorps polyclonal irrelevant de type IgG1 kappa de souris (lignée MOPC-21, Sigma-Aldrich) ou de lapin (Dako) et un anticorps monoclonal de souris anti-cytokératine 18 humaine (clone KS-B17.2, Sigma-Aldrich). Après rinçage avec une solution contenant du PBS et du polyoxyéthylènesorbitan monolaurate (Tween 20 à 0,05%, Sigma-Aldrich), les cellules sont incubées pendant 1h à température ambiante, à l'abri de la lumière, avec un anticorps secondaire de chèvre anti-immunoglobuline G de souris ou de lapin, dilué au 1/200^{ème} dans une solution de PBS-BSA à 1%, et couplé à l'Alexa Fluor®

488 (Invitrogen). Après rinçage avec du PBS, et contre-coloration des noyaux au 4',6'-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI, Sigma-Aldrich) pendant 5 minutes, les lames sont ensuite montées avec un milieu de montage dédié (Fluorescent mounting medium, Dako).

L'observation des lames est réalisée au microscope confocal C1 (Nikon). Le phénotype musculaire lisse est confirmé si les cellules sont, d'une part, positives pour les anticorps anti- α -actine et anti-calponine du muscle lisse humain, et, d'autre part, négatives pour l'anticorps anti-cytokératine 18 humaine, marqueur épithélial, et les anticorps irrelevant de même isotype (Figure 14). Outre l'analyse morphologique et phénotypique des cellules, l'immunocytochimie permet également de vérifier l'absence de contamination par les mycoplasmes [249].

Figure 14 : Phénotypage des CML par immunocytochimie.

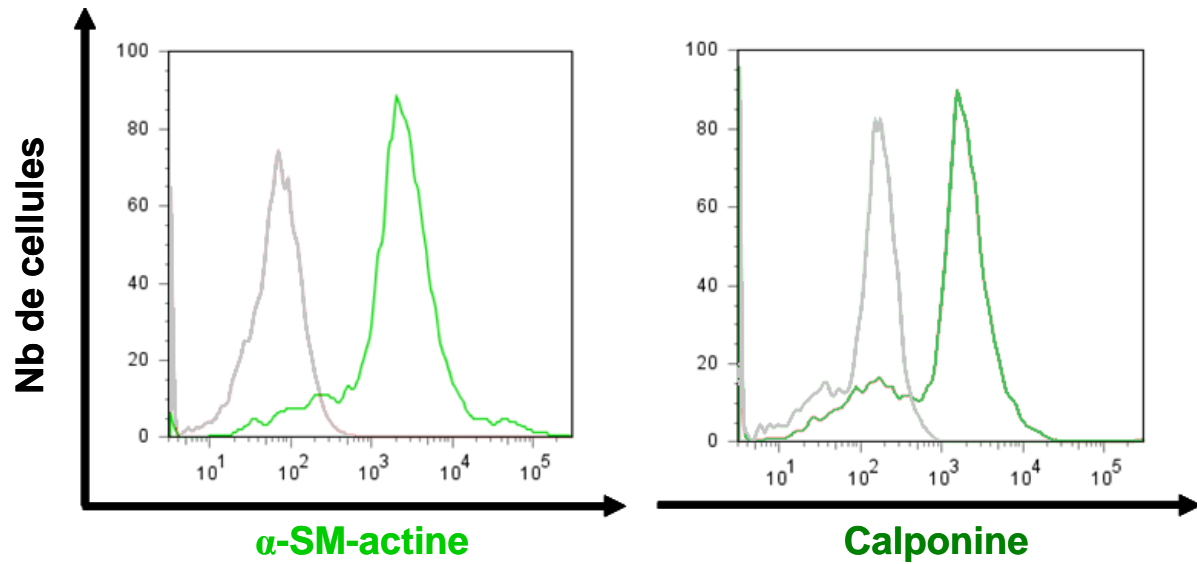


Légende : Photographies réalisées au grossissement x60 sous microscope confocal C1 (Nikon), après reconstruction en 3 dimensions de 20 coupes de 0,25 μm d'épaisseur. Les cellules proviennent d'un sujet témoin (A, B, C) et d'un patient asthmatique (D, E, F). Les lames sont marquées par un anticorps anti- α -actine musculaire lisse (B, E), anti-calponine (C, F) ou anti-cytokératine (A, D), puis par un anticorps secondaire couplé à l'Alexa Fluor 488[®]. Les noyaux sont colorés en bleu au DAPI.

Cytométrie en flux

Après fixation et perméabilisation des cellules au paraformaldéhyde (PFA, Sigma-Aldrich) à 4% et saponine (Sigma-Aldrich) à 0,1%, la saturation des sites de fixation membranaire non spécifiques est réalisée par l'addition d'une solution de PBS-BSA à 1%. Les anticorps primaires, identiques à ceux utilisés en immunocytochimie, sont dilués dans une solution de PBS-BSA à 1% et incubés pendant 1h à 4°C. Des témoins négatifs sont réalisés avec un anticorps polyclonal irrelevant de type IgG1 kappa de souris (lignée MOPC-21, Sigma-Aldrich) ou de lapin (Dako). Après rinçage dans une solution de PBS-BSA à 1%, les cellules sont incubées avec un anticorps secondaire de chèvre anti-immunoglobuline G de souris ou de lapin, couplé à l'Alexa Fluor[®] 488 (Invitrogen), pendant 1h à 4°C, à l'abri de la lumière. Pour chaque condition expérimentale, 10 000 cellules sont analysées par le cytomètre en flux (FACSCanto[®], Beckton Dickinson), grâce à l'utilisation du logiciel Diva[®]. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules positives. Le phénotype musculaire lisse est confirmé si les cellules ont un pourcentage de cellules positives pour l' α -actine musculaire lisse et la calponine supérieur à 75% (Figure 15). Avec un pourcentage plus faible en calponine, on considère que les cellules sont des myofibroblastes.

Figure 15 : Phénotypage des CML par cytométrie en flux.



Légende : Histogrammes de distribution de la fluorescence représentant en vert l'expression de l' α -actine musculaire lisse ou de la calponine, et en gris, la fluorescence des cellules incubées avec l'anticorps irrelevant.

II – A – 3. Congélation des CML

Après confirmation du phénotype musculaire lisse et amplification des cellules, celles-ci sont utilisées à l'état frais ou congelées dans l'azote liquide. Pour cela, le culot cellulaire obtenu à partir d'un flacon de 75 cm² après centrifugation des cellules à 1500 tours/min, pendant 5 minutes à 4°C, est remis en suspension dans une solution constituée de SVF (Invitrogen) et de 8% de dimethyl sulfoxide (DMSO, Dutscher, Brumath, France), ce dernier étant un cryoprotecteur cellulaire. La congélation est effectuée selon un gradient de température de façon à éviter le choc thermique, par une 1^{ère} étape de 2h à -20 °C, suivie de 12h à -80 °C, avant transfert dans l'azote liquide.

La décongélation, quant à elle, est réalisée rapidement, en remettant en suspension les cellules congelées dans 1 mL de milieu de culture, avant de les remettre dans l'incubateur à 37°C dans un flacon de 75 cm². Le phénotype de ces cellules décongelées est de nouveau vérifié comme précédemment.

II – B – Culture des cellules épithéliales bronchiques humaines

II – B – 1. Lignée

La lignée HBE (Human Bronchial Epithelial cells, du Dr. Dieter Gruenert, Université de Californie, San Francisco, Etats-Unis) est cultivée dans le même milieu que les CML (DMEM + acides aminés + antibiotiques + 10% SVF, Invitrogen et Sigma-Aldrich). Les cellules sont passées dans des plaques 12 puits (50 000 cellules/1ml/puits). Lorsque les cellules sont proches de la confluence, elles sont stimulées pendant 24h, avec du Dpter (Stallergenes, 10µg/ml) ou du rhinovirus (HRV-16, du Dr Brian Oliver, Sydney, Australie, MOI 1 ou 5) avec du milieu de culture à 1% de SVF (Sigma-Aldrich). Pour l'infection au

HRV-16, on ne met que 400µl/puits dans un premier temps, à agiter pendant 30 minutes à température ambiante, puis on place la plaque à l'incubateur pendant 30 minutes et ensuite on complète chaque puits avec 600µl du milieu de culture 1% SVF (Sigma-Aldrich). 24 heures après la stimulation, les surnageants de culture sont centrifugés et stockés à -80°C. Dans le cas de la stimulation au HRV-16, les surnageants sont répartis dans des plaques 12 puits (200µl/puits) et passés aux UV pendant 5 min pour inactiver les rhinovirus, avant d'être stockés. L'efficacité de l'inactivation sera appréciée par une titration du HRV-16.

II – B – 2. Culture primaire

Les cellules épithéliales bronchiques primaires sont obtenues à partir des mêmes spécimens de témoins et d'asthmatiques que pour les CML. Avant d'obtenir les biopsies de muscle lisse sur les prélèvements bronchiques, on retire des bandes d'épithélium que l'on met ensuite en culture dans des flacons de 175 cm². Dans un premier temps, le milieu de culture utilisé est du BEGM (Lonza, Levallois-Perret, France), puis lorsque les cellules sont confluentes, elles sont passées dans des inserts (Corning), 200 000 cellules/inserts afin de les cultiver en interface air/liquide (ALI). Dans une plaque 24 puits, 1ml de milieu de culture (BEGM + DMEM, Lonza) est déposé dans le puit du fond, de telle sorte que la base de l'insert soit à peine immergée. Les cellules à l'intérieur de l'insert vont alors se développer jusqu'à confluence, créant une « barrière » épithéliale, qui sera même capable de produire du mucus. Une fois les cellules en ALI, elles sont stimulées tout comme les HBE, avec le Dpter ou le HRV-16.

II – C – Production et titration du rhinovirus

Généralités

Les rhinovirus font partie de la famille des *Picornaviridae*. Ce sont des virus à ARN simple brin (+), dont on dénombre plus de 100 sérotypes. Ces sérotypes sont divisés en 2 groupes majeurs : les HRV-A, sensibles aux agents antiviraux, et les HRV-B, insensibles aux agents antiviraux [250]. Un troisième groupe, HRV-C, a été identifié chez des enfants hospitalisés pour maladie respiratoire [251 , 252]. Le HRV-16 que nous utilisons fait partie du groupe majoritaire HRV-A. La capside des rhinovirus est composée de 60 copies de chacune des 4 protéines structurales. VP1, VP2 et VP3 (VP = Virus Protein) sont les protéines de surface de la capside responsables de la diversité antigénique et VP4, conservée à l'intérieur de la capside, se fixe à l'ARN. ICAM-1 (InterCellular Adhesion Molecule-1) est le récepteur d'entrée principale dans la cellule pour 90% des sérotypes. Les 10% restant peuvent rentrer par les récepteurs aux LDL (Low Density Lipoprotein).

Production

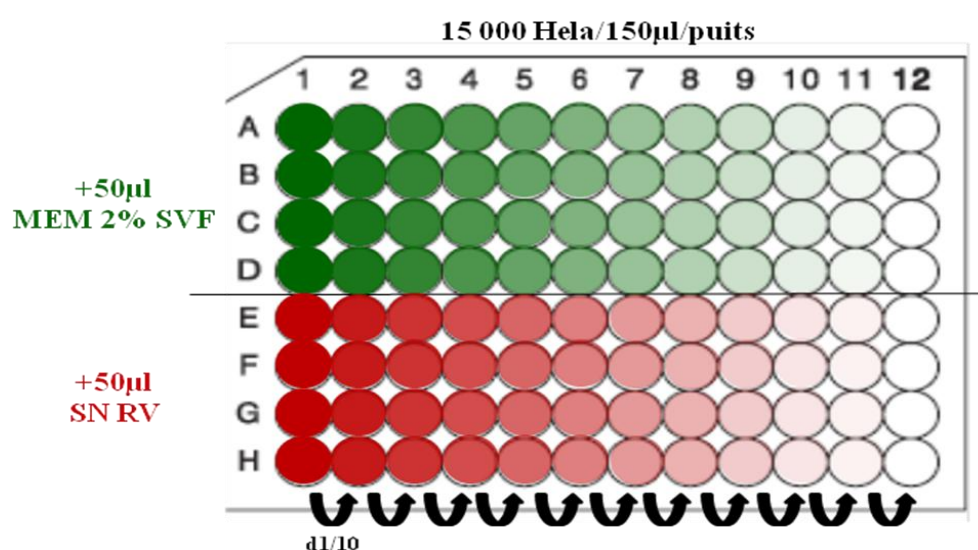
La réplication virale se fait dans les cultures *in vitro* de cellules HeLa (Ohio HeLa). Ces dernières sont cultivées dans du MEM (Minimal Essential Medium, HEPES, GlutaMAX™, Life Technologies, Saint Aubin, France) complété avec 10% SVF (Sigma-Aldrich). Lorsque les cellules atteignent 80% de confluence dans un flacon de culture de 75 cm², elles sont rincées une première fois avec le milieu MEM (Life Technologies) à 2% SVF (Sigma-Aldrich), qui correspond au milieu pour l'infection. Ensuite, 8ml de ce milieu sont mélangés à 2ml de surnageant de cellules infectées par HRV-16. Les cellules sont mises à agitation douce pendant 30 minutes à température ambiante, puis sont remises à l'incubateur. La durée de l'infection varie de 24 à 48 heures. Lorsque les cellules sont en train de mourir,

on place le flacon de culture à -80°C. Les cellules sont ensuite décongelées pour les détruire et ainsi libérer un maximum de rhinovirus dans le milieu. Après centrifugation, le surnageant obtenu contenant le rhinovirus est aliquoté et conservé à -80°C et servira aux infections ultérieures sur les cellules épithéliales. Ce même surnageant infecté peut de nouveau servir à d'autres amplifications rhinovirales.

Titration

Pour infecter les cellules épithéliales à des MOI (Multiplicity of Infection) données, il faut d'abord connaître le titre viral de notre préparation. Pour se faire, onensemence une plaque 96 puits avec les cellules HeLa (15 000 cellules/150µl/puits) dans le milieu MEM (Life Technologies) à 2% SVF (Sigma-Aldrich). Dans la première colonne de la plaque, on rajoute 50µl/puits de milieu MEM 2% SVF dans les 4 premières lignes et 50µl/puits du surnageant infectieux à tester dans les 4 dernières lignes. Ensuite, on réalise des dilutions successives au 1/10 dans les colonnes suivantes (Figure 16).

Figure 16 : Titration du rhinovirus.



Après 4 à 5 jours d'incubation, la plaque est vidée d'un coup sec et le compte du nombre de puits vides (= cellules mortes) est effectué. La concentration virale est déterminée par la plus faible concentration qui cause un effet cytotoxique dans 50% des puits (tissue culture infective dose 50 [TCID₅₀]). Une TCID₅₀ de 1 correspond à une MOI de 1 (1 virion/cellule). Pour obtenir le TCID₅₀, on utilise la formule : $-\log_{10} \text{TCID}_{50} = L - D(S - 0.5)$.

Avec :

L = log de la dilution du surnageant infecté à tester, donc en l'utilisant pure on a $\log 1 = 0$.

D = la différence du log de la dilution sérielle utilisée, donc $-\log (1/10) = 1$.

S = score obtenue en fonction du nombre de puits vides (1 puits vide = 0.25)

Donc $\text{TCID}_{50} = 1.10^{-(0-1(\text{score}-0.5))}$ et $\text{TCID}_{50}/\text{ml} = [1.10^{-(0-1(\text{score}-0.5))}] * (1000/50)$

II – D – Expression protéique et transcriptionnelle

II – D – 1. Cytométrie en flux

Le décollement des cellules à la trypsine-EDTA (Invitrogen) suivi d'une centrifugation de 5 minutes à 1500 tours/min à 4°C permettent l'obtention d'un culot cellulaire, rincé secondairement dans 1 mL de PBS/BSA à 0,5%. Après centrifugation, les cellules sont fixées et perméabilisées sur la nuit à 4°C dans 500 µL de solution de fixation/perméabilisation (eBioscience, BD, Le pont de Claix, France). Deux rinçages grâce à un tampon de perméabilisation (eBioscience) sont alors effectués et l'anticorps primaire monoclonal de souris anti-PAR-2 (SAM11, Santa Cruz) ou l'anticorps anti-CystLT1 Receptor (anti récepteur leucotriène, Cayman) ou l'anticorps irrelevant de type IgG2a de souris sont appliqués pendant 30 minutes à 4°C. Un rinçage avec 1 mL de tampon de perméabilisation permet ensuite d'éliminer l'excès d'anticorps primaire. La même opération est réalisée avec l'anticorps secondaire de chèvre anti-IgG de souris, couplé au FITC (Fluorescein

isothiocyanate, Beckman Coulter), incubé pendant 30 minutes à 4°C. Après rinçage et centrifugation, le culot cellulaire est suspendu dans 300 µL de PBS (Invitrogen).

Pour chaque condition expérimentale, 10 000 cellules sont analysées par le cytomètre en flux (FACScanto[®], Beckton Dickinson), grâce à l'utilisation du logiciel Diva[®].

II – D – 2. Western blot

Extraction des protéines totales

Les cellules sont recueillies par une solution de trypsine-EDTA (Invitrogen), puis lysées dans 50 µL d'une solution composée d'inhibiteurs de protéases (Roche) dilué au 1/50 avec du Rippa Buffer (Sigma) à 4°C. La concentration des protéines est ensuite mesurée selon la méthode de Lowry en comparaison à une gamme étalon, après lecture à 750 nm.

Les protéines sont alors dénaturées dans un tampon contenant 2% de sodium dodécyl sulfate (SDS), 20% de glycérol, 20 mM de Tris-HCl, 2 mM d'EDTA, 80 mM de β-mercapto-éthanol et 1% bleu de Bromophénol, puis chauffées à 90°C pendant 5 minutes [253].

Western blot

20 µg de protéines sont déposées sur un gel dénaturant à 10% d'acrylamide ((Acrylamide/bis-Acrylamide, SDS (Carlo Erba), persulfate d'ammonium et N'-tétraméthylènediamine (TEMED, Qbiogene)). Après migration, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose PVDF (Polyvinylidene fluoride, ImmobilonTM-P). Les sites de fixation non spécifiques sont alors bloqués pendant 1h à température ambiante dans une solution de PBS-Tween 0,1% et BSA 5% ou PBS-Tween 0,1% et lait 5%, puis les membranes sont incubées sur la nuit avec différents anticorps primaires, dont la nature et la concentration sont spécifiées dans le tableau 13. Après trois lavages dans du PBS-Tween

0,1%, un anticorps secondaire de chèvre anti-IgG de souris ou de chèvre (Bio-Rad) couplé à l'enzyme « horseradish peroxydase » (HRP) est alors appliqué pendant 30 minutes à température ambiante sur les membranes. Après trois autres lavages, les membranes sont révélées en chambre noire au moyen du kit Uptilight (Interchim) contenant un substrat chimioluminescent de la peroxydase. Un film radiographique est ensuite apposé sur les membranes afin de récupérer une empreinte de chimioluminescence. La densité des bandes est appréciée grâce au logiciel ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). La révélation des bandes peut aussi se faire sur l'appareil de mesure LAS-3000 Imaging System (FUJI) et l'analyse des bandes avec le logiciel MultiGauge (FUJI).

Pour permettre la normalisation des résultats, la quantité de β -actine présente sur la membrane est mesurée, sa quantité étant stable dans les CML [253]. Cependant, le poids moléculaire de la β -actine étant proche de certaines des protéines étudiées, les membranes sont incubées, après la révélation de la protéine d'intérêt, dans du Stripping buffer (RestoreTM Western Blot, Pierce), pendant 15 minutes afin d'éliminer le marquage de la protéine. Les membranes sont alors incubées avec l'anticorps primaire dirigé contre la β -actine (Sigma) pendant 1h à 4°C. Comme précédemment, les mêmes protocoles de révélation et d'analyse sont utilisés.

Les résultats sont exprimés sous la forme d'un ratio de la densité des bandes de la protéine d'intérêt normalisée par rapport à celle des bandes de β -actine.

Tableau 13 : Récapitulatif des anticorps utilisés en Western blot.

Réf	Protéine	Dilution	Tps d'incubation	T°
sc-52331	Fibronectine 220kDa	1/ 500	ON	4°C
Biorad	GAM-HRP	1/ 5 000	30min	RT
A5316	β -actine 42kDa	1/10 000	1h	RT
Biorad	GAM-HRP	1/10 000	30 min	RT
A5316	β -actine 42kDa	1/50 000	ON	4°C
Biorad	GAM-HRP	1/10 000	30 min	RT
sc-55605	Laminin α 2 300kDa	1/ 500	ON	4°C
Biorad	GAM-HRP	1/ 5 000	30min	RT
sc-13504 (SAM11)	PAR-2 50-100kDa	1/ 1 0	ON	4°C
Biorad	GAM-HRP	1/ 5 000	30min	RT
9102S	ERK 42-44kDa	1/ 5 000	ON	4°C
Cell Signaling	GAR-HRP	1/ 5 000	1h	RT
9106S	P-ERK 42-44kDa	1/ 2 000	ON	4°C
Cell Signaling	GAM-HRP	1/ 5 000	1h	RT
9272S	AKT 60kDa	1/ 5 000	ON	4°C
Cell Signaling	GAR-HRP	1/ 5 000	1h	RT
4060	P-AKT 60kDa	1/1000	ON	4°C
Cell Signaling	GAR-HRP	1/ 5 000	1h	RT
9218	P38 40kDa	1/ 5 000	ON	4°C
Cell Signaling	GAR-HRP	1/ 5 000	1h	RT
4511S	P-P38 43kDa	1/1000	ON	4°C
Cell Signaling	GAR-HRP	1/ 5 000	1h	RT
ab89818	mtTFA 29kDa	1/ 500	ON	4°C
Abcam	GAM-HRP	1/ 2 000	1h	RT
ab55744	NRF1 54kDa	1/ 500	ON	4°C
Abcam	GAM-HRP	1/ 2 000	1h	RT
ab77210	PGC1 α 91kDa	1/ 500	ON	4°C
Abcam	GAM-HRP	1/ 2 000	1h	RT
ab14734	Porine 39kDa	1/ 500	ON	4°C
Abcam	GAM-HRP	1/ 2 000	1h	RT

Légende : GAM: goat anti mouse ; GAR : goat anti rabbit ; ON : over night ; RT : room temperature.

II – D – 3. ELISA

La synthèse de plusieurs cytokines, *i.e.* TGF- β 1, IP-10, IL-8 ou SCF, par les CML, ainsi que IL-25, IL-33, TSLP et leucotriènes par les cellules épithéliales est mesurée sur les surnageants, grâce à l'utilisation de kits ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay, Quantikine ELISA Kits, R&D Systems).

Brièvement, les surnageants sont ajoutés aux microplaques pré-coatées avec un anticorps monoclonal spécifique pour les différentes cytokines. Après lavage, un anticorps secondaire lié à une peroxydase est ensuite ajouté. Enfin, une solution substrat de l'enzyme permet une révélation colorimétrique grâce à un lecteur de microplaques à 450 nm, avec une correction à 570 nm.

II – D – 4. Immunocytochimie

Pour préciser la localisation cellulaire des protéines, un marquage est réalisé en immunocytochimie. Après rinçage avec un tampon phosphaté (PBS, Invitrogen), les cellules sont fixées et perméabilisées avec du méthanol (Sigma-Aldrich) à -20°C pendant 20 minutes. La saturation des sites de fixation non spécifiques est réalisée par l'addition d'une solution de BSA à 3% (Sigma-Aldrich) diluée dans du PBS, pendant 30 minutes, à température ambiante. L'anticorps primaire utilisé est dilué dans une solution de PBS-BSA à 1% et incubé généralement pendant 1h à température ambiante. Un témoin négatif est réalisé avec un anticorps irrelevant. Après rinçage avec une solution contenant du PBS et du polyoxyéthylènesorbitan monolaurate (Tween 20 à 0,05%, Sigma), les cellules sont incubées pendant 1h à température ambiante, à l'abri de la lumière, avec un anticorps secondaire de chèvre anti-immunoglobuline G de souris ou de lapin, dilué dans une solution de PBS-BSA à 1%, et couplé à l'Alexa Fluor[®] 488 (Invitrogen). Après rinçage au PBS (Invitrogen), et contre-coloration des noyaux au DAPI (Sigma) pendant 5 minutes, les lames sont ensuite

montées avec un milieu de montage dédié (Fluorescent mounting medium, Dako). L'analyse des lames est réalisée au microscope confocal C1 (Nikon), après reconstruction en trois dimensions.

II – D – 5. Immunohistochimie

Inclusion

L'inclusion dans la paraffine a été réalisée par le service d'anatomopathologie de l'hôpital Haut-Lévêque (CHU de Bordeaux). Brièvement, les échantillons biopsiques sont fixés dans du formol tamponné à 10%, puis inclus en paraffine. Des coupes de 4 µm d'épaisseur sont réalisées au microtome.

Coloration immunohistochimique

L'étape première consiste en un déparaffinage des coupes au moyen de trois bains de toluène de 3 minutes chacun, suivie d'une réhydratation par passage des sections dans des bains d'alcools décroissants (absolu, 95°, 70°), puis d'eau. S'ensuit une étape de démasquage antigénique par la chaleur dans un tampon citrate à pH 6, à la cocotte minute, pendant 10 minutes. Une inhibition des peroxydases endogènes est alors effectuée par l'azide de sodium à 0,1% (Sigma-Aldrich) en présence de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) à 0,3%, pendant 30 minutes. Après lavage au PBS (Invitrogen), la saturation des sites de fixation membranaires non spécifiques est réalisée par l'ajout de BSA à 10% (Dako), pendant 30 min. On procède ensuite à la fixation des anticorps primaires de souris dirigés contre l'élastase du neutrophil (clone NP57, Dako), ou l'alpha actine musculaire lisse ou le récepteur aux leucotriènes. Les anticorps irrelevant de même isotype sont également utilisés comme témoins négatifs, par une incubation de 30 minutes à température ambiante. Après rinçage, selon la méthode du

complexe avidine-biotine, un anticorps secondaire biotinylé de lapin anti-souris ou anti-rat (Dako) est ajouté pendant 30 minutes, puis un complexe streptavidine-péroxydase biotinylée (Dako) est appliqué pendant 30 minutes. La réaction est révélée par l'ajout d'un chromogène (DAB, Diaminobenzidine tetrahydrochloride, Dako), se colorant en brun lors de la présence d'un donneur d'électron, l' H_2O_2 , pendant 5 minutes. Enfin, une contre-coloration à l'Hématoxyline-Meyer permet de colorer les noyaux en bleu.

Analyse des résultats

Après acquisition des images au NanoZoomer de la plateforme du BIC (Bordeaux Imaging Center), l'intensité du marquage, et les surfaces des tissus bronchiques sont évalués à l'aide du logiciel Mercator (Explora Nova). La surface du muscle lisse bronchique est normalisée à la surface totale du tissu correspondant et représentée en pourcentage de surface totale. Le nombre de neutrophiles dans le tissu est déterminé en utilisant un seuillage réglé sur la coloration brune de l'anticorps. L'intensité du marquage des récepteurs aux leucotriènes est déterminée par le même procédé de seuillage

II – D – 6. RT-PCR quantitative en temps réel

Extraction des ARN totaux

Afin de déterminer l'expression des différentes protéines au niveau transcriptionnel, les cellules sont rincées 2 fois à l'HBSS (Invitrogen) et les ARN totaux sont extraits à l'aide du kit NucleoSpin RNase II (Macherey-Nagel). Brièvement, les cellules sont lysées dans un tampon permettant d'inactiver les RNases, auquel est ajouté du β -mercapto-éthanol afin de réduire les ponts disulfures. Les lysats sont ensuite filtrés sur des colonnes spécifiques, qui permettent de diminuer leur viscosité. Un traitement des cellules à l'éthanol à 70%, suivi d'une

centrifugation à 11000 g pendant 30 secondes, permet la fixation de l'ARN sur la membrane de la colonne. Les échantillons sont ensuite incubés pendant 15 minutes à température ambiante en présence de DNase, afin d'éliminer une éventuelle contamination par l'ADN. Après 3 lavages successifs, l'ARN pur est finalement élué dans de l'eau RNase-free.

La concentration en acides nucléiques est mesurée par spectrophotométrie à 260 nm et rapportée à la concentration en protéines mesurée à 280 nm. Le ratio des densités optiques DO_{260nm}/DO_{280nm} permet d'apprécier la pureté des échantillons.

Reverse Transcription (RT)

Les ARNm extraits sont transformés en ADN complémentaire (ADNc) par transcription inverse. Pour cela, 1 µg d'ARN totaux est mis en présence d'amorces d'oligo-dT (Promega), de 10 mM de désoxyribonucléotides (dNTP, Promega), d'un inhibiteur de ribonucléases (RNasin, Promega) et de 20 U/µL de transcriptase inverse AMV (Avian myeloblastosis virus, Promega). Les amorces d'oligo-dT permettent de rétrotranscrire les ARNm, via une hybridation avec les queues poly-A, et non les ARN ribosomaux qui en sont dépourvus. Cette transcription inverse s'effectue pendant 1h à 42°C, suivie de 5 minutes à 94°C pour inactiver l'enzyme.

Polymerase Chain Reaction (PCR) en temps réel

La quantification des ADNc par PCR en temps réel est réalisée par la méthodologie SYBR-Green I (Molecular Probes), un agent intercalant non spécifique de l'ADN double-brin émettant une fluorescence à 585 nm lorsqu'il est excité à 470 nm. Ainsi, il est possible d'apprécier indirectement la quantité d'ADNc, grâce à l'intensité de fluorescence émise à chaque cycle. La spécificité du signal analysé dépend des amorces et de la température d'acquisition choisie. Les paires d'amorces spécifiques, délivrées par Sigma-Genosys, sont conçues grâce au logiciel Oligo 6.6 (Molecular Biology Insights), après avoir vérifié l'absence de complémentarité

significative de ces amorces avec d'autres gènes humains par une recherche de type BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov). Les différentes amorces utilisées sont présentées dans le Tableau 14.

Tableau 14 : Caractéristiques des amorces utilisées en RT-PCR quantitative (concentration des amorces à 200nM).

Gènes (Numéro d'accession)	Hybridation	Élongation	Acquisition	Séquences des amorces
PAR-2 (NM_005242)	62°C 15 sec	70°C - 25 sec	83°C	S : 5'-CCGAAC TAAGAAGAAGCACC-3' AS : 5'-AGAAAAAGCCAATAAGCACAT-3'
5LO (ALOX5) (NM_000698)	70°C - 30 sec	70°C - 30 sec	83°C	S : 5'-CAAGGGAACATTTTCATCGTG-3' AS : 5'-TGGAAGTCACTGGAACGCAC-3'
FLAP (ALOX5AP) (NM_001629)	70°C - 30 sec	70°C - 30 sec	80°C	S : 5'-GCCAACCAGAACTGTGTAGATG-3' AS : 5'-TATGCCAGCAACGGACAT-3'
15LO (ALOX15) (NM_001140)	70°C - 30 sec	70°C - 30 sec	84°C	S : 5'-TATCGGTATGTGGAAGGAATCGT-3' AS : 5'-GTGCACAGAGGCGTGTG-3'
LTC4S (NM_145867)	70°C - 30 sec	70°C - 30 sec	84°C	S : 5'-TGTTCTCTGCCACGCTCTG-3' AS : 5'-GCGCGAACAGGTAGACCA-3'
LTA4H (NM_000895)	70°C - 30 sec	70°C - 30 sec	81°C	S : 5'-CTACTCTACTGGCAGGCGACA-3' AS : 5'-AAACAATCGTCCGCAATG-3'
mtTFA (NM_003201)	70°C - 30 sec	70°C - 30 sec	82°C	S : 5'-GAAGTCGACTGCGCTCCC-3' AS : 5'-ACTCCGCCCTATAAGCATC-3'
NRF-1 (NM_005011)	70°C - 35 sec	70°C - 35 sec	82°C	S : 5'-AAGATCAGCAAACGCAAAACAC-3' AS : 5'-CCCGTACCAACCTGGATAAGT-3'
PGC1-α (NM_013261)	64°C - 20 sec	70°C - 25 sec	84°C	S : 5'-GTCACCACCCAAATCCTTATT-3' AS : 5'-GGCGATCTTGAACGTGAT-3'
PO (NM_001002)	70°C - 28 sec	70°C - 28 sec	85°C	S : 5'-CAACGGGTACAAACGAGTC-3' AS : 5'-CTTCCTTGGCTTCAACCTTAG-3'
HPRT-1 (NM_000194)	64°C - 13 sec	70°C - 23 sec	79°C	S : 5'-TGTTGGATATGCCCTTGACTA-3' AS : 5'-AGATGGCCACAGGACTAGAAC-3'
YWHAZ (NM_003406)	68°C - 13 sec	70°C - 23 sec	80°C	S : 5'-GGGGATGTGGAATTTTATACAAG-3' AS : 5'-CGCCAGGACAAACCAGTATGTAG-3'
β2M (NM_004048)	70°C - 30 sec	70°C - 30 sec	82°C	S : 5'-CTCCGTGGCCTTAGCTGT-3' AS : 5'-AGTCAACTTCAATGTCGGATGG-3'

AS : Anti-sens ; β2M : beta-2-microglobulin ; 15LO : Arachidonate 15-lipoxygénase (ALOX15) ; 5LO : Arachidonate 5-lipoxygénase (ALOX5) ; FLAP : Arachidonate 5-lipoxygénase-activating protein (ALOX5AP) ; HPRT-1 : Hypoxanthine phospho-ribosyl-transferase 1 ; LTA4H : Leukotriene A4 hydrolase ; LTC4S : Leukotriene C4 synthase ; mtTFA : Mitochondrial transcription factor A ; NRF1 : Nuclear respiratory factor 1 ; PAR-2 : Protease activated receptor-2 ; PGC1-α : Peroxisome-proliferator activated receptor gamma co-activator 1-α ; PO : Human acidic ribosomal phosphoproteins ; S : Sens ; YWHAZ : Tyrosine-3-mono-oxygénase/tryptophane 5-monooxygénase activation protein, zeta polypeptide

Pour chaque PCR, le milieu réactionnel (10 µL) contient l'ADNc, l'enzyme Titanium™ « Taq DNA Polymerase », le tampon de PCR (Clontech), 1 mM de dNTP, 100 ou 200 nM de chaque amorce et l'agent intercalant SYBR Green I.

La réaction de PCR est réalisée dans un thermocycleur à rotor multi-canaux, de type Rotor-Gene™ 2000 (Corbett Research), permettant la quantification en temps réel des transcrits. Après 60 secondes initiales à 95°C d'activation de la Taq, chaque cycle de PCR comprend successivement une dénaturation de 15 secondes à 95°C, une hybridation et une élongation, dont la température et la durée varie selon les amorces (Tableau 15). Pour éliminer les signaux de fluorescence non spécifiques, l'émission de fluorescence est mesurée à la fin de chaque étape d'élongation à une température d'acquisition inférieure de 3,5°C par rapport à la température de fusion de l'amplicon. Les témoins négatifs (eau stérile) sont systématiquement effectués lors des étapes de transcription inverse et de PCR. L'efficacité des réactions de PCR est toujours supérieure à 90%. La spécificité des produits de PCR est analysée avec les courbes de fusion et sur gel d'agarose à 2%.

La normalisation des données de RT-PCR nécessite la moyenne géométrique de 3 gènes domestiques, dont l'expression est constitutive. L'expression des résultats est donc présentée en ratio des ARNm des protéines d'intérêt par rapport à des références endogènes (human acidic ribosomal phosphoproteins (PO) ; hypoxanthine phospho-ribosyl-transferase 1 (HPRT-1) ; tyrosine-3-mono-oxygenase/tryptophane 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide (YWHAZ)) selon une analyse geNorm (<http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/>).

II – E – Prolifération cellulaire

La prolifération cellulaire est évaluée par l'incorporation de Bromodéoxyuridine (5-bromo-2'-deoxyuridine, ou BrdU). Ce nucléoside synthétique est un analogue de la thymidine. Il est incorporé lors de la synthèse d'ADN.

Conditions expérimentales de culture

Brièvement, 2000 cellules/puits sont déposées sur une plaque de culture à 96 puits. Après 24h d'adhésion suivie de 24h de synchronisation, les cellules sont stimulées par le SLIGKV ou le surnageant épithélial stimulé diluée dans du milieu DMEM (Invitrogen) pendant 24 à 48h. Par ailleurs, le PDGF (Platelet derived growth factor, R&D Systems), dont l'effet est connu pour favoriser la prolifération des CML [254], est utilisée à 10 ng/mL, à titre de témoin positif. Le milieu DMEM sans SVF sert de condition témoin. Toutes les conditions expérimentales sont réalisées en quadruplicat.

Protocole expérimental

La synthèse d'ADN est mesurée à l'aide d'un kit d'incorporation de BrdU (Roche Diagnostic). 10 μ M de BrdU sont ainsi ajoutés à chaque puit pendant 24h. Les cellules sont ensuite fixées et dénaturées par une solution alcoolisée (Solution Fix-denat, Roche Diagnostic) pendant 30 minutes, à température ambiante. Le BrdU incorporé est révélé par un anticorps anti-BrdU couplé à la peroxydase pendant 2h, à température ambiante. Après trois rinçages au PBS (Invitrogen), une solution substrat de la peroxydase (Tetramethylbenzidine, TMB, Roche Diagnostic) permet une révélation colorimétrique de l'anti-BrdU grâce à un lecteur de microplaque à 370 nm. Les résultats sont exprimés en ratio par rapport à la valeur obtenue pour les cellules non stimulées.

II – F – Migration des Neutrophiles

II – F – 1. Isolation des neutrophiles

Les neutrophiles représentent à eux seuls environ 65 % de l'ensemble des leucocytes du sang, et 99 % des granulocytes. Ils sont isolés du sang périphérique par 3 étapes successives : sédimentation au Dextran, lyse des globules rouges et Ficoll. Pour éviter l'activation des neutrophiles, toutes les étapes doivent se dérouler à 4°C, en limitant les agitations. Il ne faut pas utiliser de verre car les neutrophiles y adhèrent.

Sédimentation au Dextran

Le sang de volontaire témoin est récupéré dans les tubes de prélèvement ACD (petit tube bleu avec anticoagulant citrate), puis transféré dans un tube de 50ml. Un volume de Dextran (Sigma) est ajouté au volume de sang. La solution de Dextran (6% Dextran 181 000 MW / 0.9% NaCl) aura été préparée la veille avec de l'eau stérile. Le tube contenant le sang et la solution de Dextran est mélangé 20 fois. Le mélange obtenu est laissé à température ambiante pendant 45min pour sédimenter le sang. Après sédimentation, le surnageant jaunâtre est récupéré et centrifugé à 4°C pendant 12min à 1150rpm.

Lyse des globules rouges

Après avoir vidé le surnageant, le culot est défait délicatement. Le culot est repris avec 20 ml de NaCl 0.2 %, pendant 30sec, puis on rajoute 20 ml de NaCl 1.6 % pour neutraliser la lyse. Le tube est inversé doucement 2 ou 3 fois et centrifugé à 4°C pendant 6min à 1300rpm. On peut répéter la lyse 1 ou 2 fois. Finalement le culot est repris dans 2 ml d'HBSS (Sigma).

Ficoll

Les 2ml d'HBSS contenant les cellules sont délicatement déposés sur 2ml de Ficoll (Sigma 1077, Ficoll-Paque PLUS, GE Healthcare density 1.077g/ml) dans un tube de 15ml. Après une centrifugation (1500rpm, 30min, 4°C), les PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cells) se retrouvent au-dessus du Ficoll. L'anneau de PBMCs est éventuellement conservé pour faire des expériences sur les lymphocytes. Les PMNs (polymorphonucléaires) se retrouvent culotés sous le Ficoll. Après avoir délicatement enlevé le surnageant à la pipette, le culot est resuspendu dans 2ml d'HBSS (Ca^{2+} 2mM / Mg^{2+} 1mM). Les PMNs sont dénombrés à la cellule de Neubauer avec du bleu trypan. La viabilité est $> 95\%$. Les cellules sont reprises à la concentration de $1,25 \cdot 10^6$ cell/ml soit 250 000 cell/200 μ l pour la migration. Avec cette technique on obtient une purification des neutrophiles d'environ 99%.

II – F – 2. Migration des neutrophiles

Après avoir préparé les plaques 24 puits (Companion, réf353504) avec 700µl/puits de surnageant de culture à tester, on dépose ensuite les inserts dans les encoches des puits (insert de 8µm, réf 353097). A cette étape, on peut rajouter dans les surnageant, un anticorps bloquant anti-IL-8 (ab10769 ; 1µg/ml), que l'on incube 30min à température ambiante. La préparation de neutrophiles est répartit dans les inserts (250 000 cellules/200µl/puits). Les plaques sont ensuite déposées à l'incubateur (37°C, 5%CO₂). Après 1 heure de migration, on récupère les 700µl de « sous nageant », que l'on transfère dans des tubes de 15ml préalablement disposés dans la glace. Après centrifugation des tubes (1500rpm, 5min, 4°C, frein/accélération : 9/9), le culot est repris dans 100µl de PBS et transféré dans une plaque 96 puits à fond rond.

La lecture de la plaque se fait sur le cytomètre Canto II (BD Bioscience) et l'analyse est faite sur le logiciel Diva[®].

II – G – Lentivirus

Nous avons utilisé les lentivirus pour augmenter l'expression de PAR-2 dans les CML. La modification génétique apportée par ce virus dérivé du VIH (virus d'immunodéficience humaine) permet une expression stable dans le temps. Ainsi les cellules utilisées à distance du jour de la transduction lentivirale, ne sont plus aussi fragiles et stressées par cette modification.

II – G – 1. Structure des lentivirus

Généralités

Les lentivirus sont des virus de la famille des rétrovirus, à période d'incubation longue, responsables de maladies à évolution lente, notamment du système immunitaire. Ils sont dérivés le plus souvent du HIV (Human immunodeficiency virus) ou de son équivalent chez le félin, le FIV (Feline immunodeficiency virus).

La construction des particules lentivirales se fait par l'intermédiaire de 3 plasmides différents, de façon à produire des particules virales non répliquantes capables d'entrer dans les cellules quiescentes et d'intégrer leur matériel génétique. Pour cela, ces particules lentivirales doivent contenir les protéines virales nécessaires à leur intégration dans la cellule, tout en étant dépourvues des séquences codantes de ces protéines dans leur génome. C'est le cas des protéines de structure et des protéines d'enveloppe.

3 types de plasmides (Trono Lab, Lausanne) sont ainsi utilisés pour générer des lentivirus HIV pseudotypés avec la glycoprotéine d'enveloppe du virus de la stomatite vésiculeuse (VSV-G) [255]. Il s'agit du vecteur de structure (pCMVΔP8.91), du vecteur d'enveloppe de VSV-G (pMD2G-VSVG), et d'un vecteur de transfert permettant le clonage de

l'ADNc d'intérêt. Les constructions plasmidiques de ces trois vecteurs sont présentées dans les figures 17 et 18.

Vecteur de structure

Le vecteur pCMV Δ P8.91 est un vecteur de structure issu du HIV. Il est pourvu d'un promoteur CMV (cytomégalovirus), codant pour les protéines de structure Gag, Pol, Tat et Rev. Il est dépourvu du gène d'enveloppe et du signal de packaging.

Vecteur d'enveloppe

Le vecteur pMD2G-VSVG est un vecteur d'enveloppe codant pour l'enveloppe du virus de la stomatite vésiculeuse. Le promoteur CMV nécessite un signal de terminaison poly-A en aval de la séquence codant pour l'enveloppe. Cette enveloppe permet l'entrée du lentivirus dans la plupart des cellules eucaryotes, avec toutefois une efficacité supérieure à celle de l'enveloppe du HIV qui nécessite l'expression d'un récepteur spécifique. Il est dépourvu du gène de structure (Gag-Pol) et du signal de packaging.

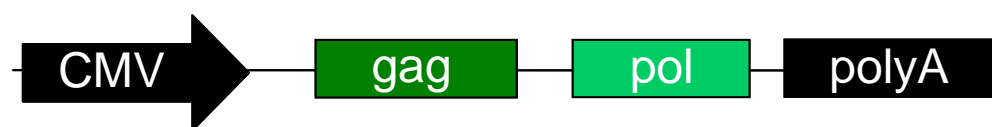
Vecteur de transfert

Le plasmide n°253 de la plateforme de vectorologie (Figure 18) est un vecteur de transfert dédié à l'expression d'un gène d'intérêt et d'un gène marqueur. Il s'agit d'un vecteur pourvu non seulement d'un cPPT (Central polypurine tract), qui va permettre une meilleure translocation nucléaire du génome lentiviral, mais aussi, d'une protéine marqueur fluorescente, la E-GFP, qui est sous la dépendance du promoteur eucaryote hPGK (Promoteur

de kinase de phosphoglycerate). Le gène d'intérêt est quand à lui sous la dépendance du promoteur MND (MPSV LTR, NCR deleted, dl587PBS, [256]). Ce vecteur ne contient pas de gène de structure (Gag-Pol) ni d'enveloppe. Il ne contient pas non plus la séquence U3, ce qui le rend SIN (Self Inactivating). Il contient par contre le signal de packaging (ψ), qui permettra à la particule lentivirale d'inclure cet ARN lentiviral.

Figure 17 : Constructions plasmidiques des deux vecteurs utilisés pour la production des particules lentivirales.

1. Vecteur de Structure (pCMV Δ P8.91)



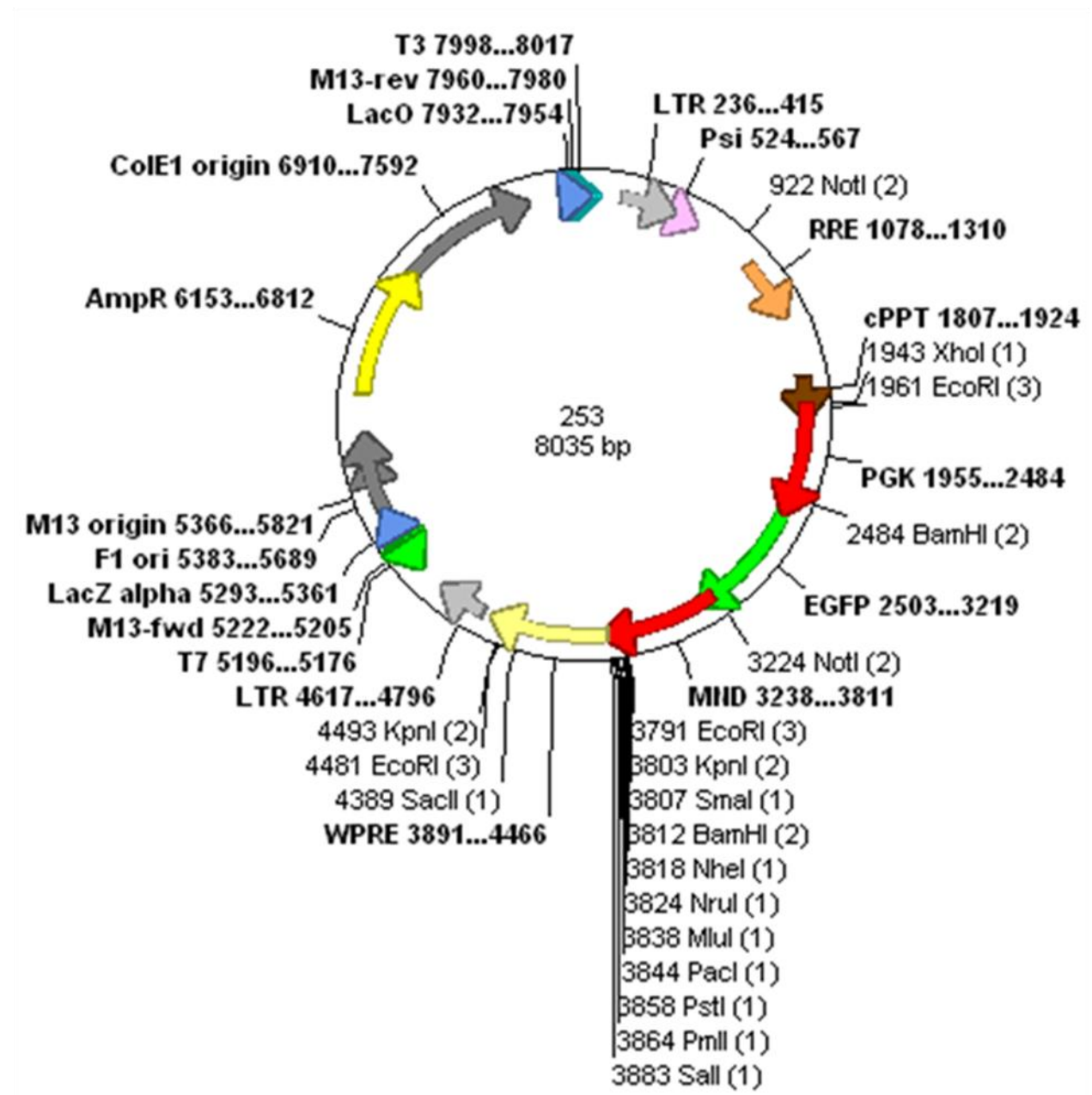
2. Vecteur d'enveloppe (pMD2G-VSVG)



Abréviations : CMV : cytomégalovirus ; gag ; group antigens ; Pol : Polymérase ; VSVG : Virus de la stomatite vésiculeuse.

Figure 18 : Construction plasmidique du troisième vecteur (plamide 253 de la plateforme de vectorologie).

pRRLSIN-PGK-EGFP-MND-MCS-WPRE

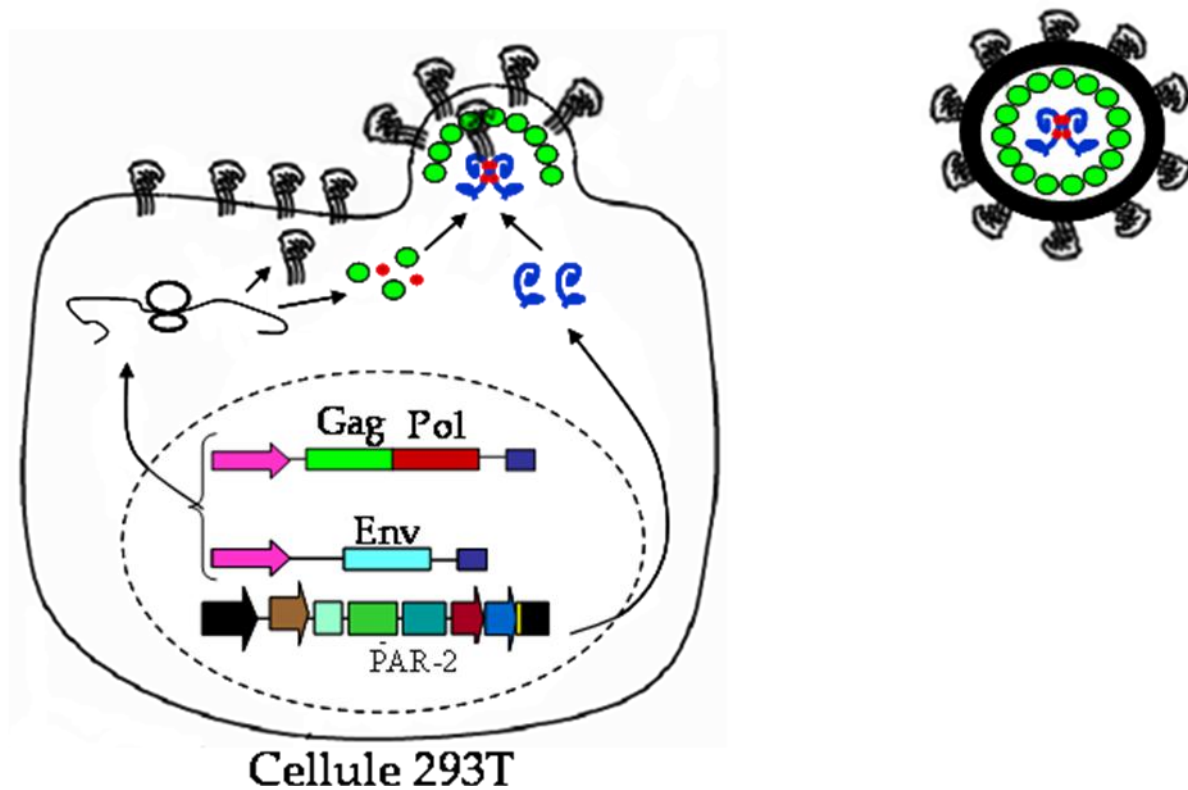


II – G – 2. Production des particules lentivirales

Le plasmide 253 est transfecté dans des bactéries compétentes (MAX Efficiency Stbl2, Invitrogen). Celles-ci sont étalées sur des boîtes de Petri contenant du milieu LB (10 g de Tryptone (BD), 5 g de Bacto Yeast (BD), 10 g de NaCl, 0,2 mL de NaOH 5 M dans 1L d'eau bi distillée), auquel on ajoute 100 µg/mL d'ampicilline, afin d'induire une pression de sélection permettant la croissance des seules bactéries transfectées. Après purification de plusieurs clones bactériens à l'aide du Kit Miniprep (Qiagen), la présence de la séquence de l'ARN de PAR-2 est contrôlée par séquençage, à l'aide d'une amorce anti-sens (5'-CAGGAAGATGGCTGTGAGG-3') et du Kit Big Dye Terminator v1.1 (Applied Biosystems). Une purification à partir d'un nombre plus important de clones bactériens est alors réalisée à l'aide du Kit Maxiprep (Qiagen) et un nouveau contrôle de la présence effective de l'insert est effectué. Parallèlement, à titre de contrôle pour les expérimentations ultérieures, un plasmide 253 vide (*i.e.* sans l'ADNc de PAR-2) est produit de façon similaire.

La production des particules virales est, à ce niveau, prise en charge par la Plateforme de vectorologie (INSERM U1035). Elle nécessite la transfection de cellules appartenant à la lignée 293T par les trois plasmides lentiviraux : plasmides de structure (10 µg), d'enveloppe VSV-G (4 µg) et de transfert (10 µg) (Figure 19). Après filtration et ajout de 50 µL de dichlorure de calcium (CaCl_2 à 2,5 M), les plasmides sont incubés 3 à 5 min avant d'être transfectés dans les 293T, dans un milieu de culture sans sérum, à 37°C pendant 8h. Après lavage et incubation pendant 48h dans un milieu adapté riche en sérum, le surnageant de culture est prélevé, centrifugé à 2500rpm, à 4°C, pendant 5 minutes, puis ultracentrifugé à 35000tours/min, à 4°C, pendant 4h, afin de recueillir les particules lentivirales.

Figure 19 : Production de particules lentivirales dans les cellules 293T.



Légende : Après transfection des 3 plasmides, les cellules 293T produisent les protéines de structure (Gag, Pol), d'enveloppe (Env), et l'ARN lentiviral contenant la séquence PAR2. Grâce au signal d'encapsulation, les cellules vont produire des particules lentivirales.

II – G – 3. Titration des particules lentivirales

La titration des particules lentivirales est réalisée sur les cellules 293T. Pour se faire, les particules lentivirales, diluées dans une gamme de concentrations décroissantes, ont permis l'infection de 5×10^4 cellules/mL en suspension avec du sulfate de protamine (Sigma), ce dernier permettant, par son apport de charges ioniques, de rapprocher les membranes virales et cellulaires. Après 5 jours, le pourcentage de cellules positives pour la GFP (Green fluorescent protein) en cytométrie en flux (FACScanto[®], Beckton Dickinson) permet de déterminer le nombre de particules infectieuses/mL pour chaque lot de particules virales produit. Les particules lentivirales sont alors aliquotées et conservées à -80°C jusqu'à leur utilisation.

II – G – 4. Transduction lentivirale des CML

Les CML sont recueillies par une solution de trypsine-EDTA (Invitrogen), avant d'être comptabilisées grâce à une cellule de Neubauer. Les cellules sont ensuiteensemencées dans des plaques 12 puits (100 000 cellules/puit). Les transductions sont réalisées avec le lentivirus vide ou contenant la séquence de PAR-2 à une MOI (Multiplicity of infection) de 20, correspondant à une transfection théorique de 20 particules lentivirales/cellule. Afin d'augmenter les probabilités d'infection, les volumes finaux d'infection ont été adaptés à 250µL pour les plaques 12 puits.

II – G – 5. Vérification de l'efficacité de la transduction lentivirale

7 jours après la transduction lentivirale, l'efficacité est vérifiée en cytométrie en flux (FACScanto[®], Beckton Dickinson), par l'analyse de la fluorescence de la GFP. Par ailleurs, le nombre de copies d'ADN viral (gène WPRE, Woodchuck hepatitis virus post-transcriptional

regulatory element) intégré dans l'ADN de la cellule hôte a également été évalué par PCR quantitative par la Plateforme de vectorologie.

En outre, l'efficacité de la transduction lentivirale est déterminée par l'analyse de l'expression de la cible au niveau protéique et transcriptionnel.

II – H – Analyse statistique

L'analyse statistique a été réalisée sur le logiciel GraphPad (Prisme). Les valeurs sont représentées en moyenne \pm SEM ou SD. Les tests utilisés sont principalement les tests de comparaison de deux échantillons indépendants (Mann & Whitney) ou appariés (Wilcoxon) pour variables non paramétriques. Une valeur de $p < 0.05$ est considérée comme statistiquement significative.

CHAPITRE III :

Résultats et

Discussion

I – A – Étude de l'expression et de la fonction du PAR-2 dans les cellules musculaires lisses bronchiques d'asthmatiques

L'infiltration mastocytaire du muscle lisse bronchique ou myosite mastocytaire [73] est une caractéristique majeure de l'asthme [242]. Elle fait intervenir une boucle d'auto-activation positive entre la CML et le mastocyte [73, 77]. La présence d'une dégranulation mastocytaire au sein même du muscle lisse [46] conforte le principe d'une stimulation chronique de la CML *in vivo* par les médiateurs mastocytaires. La tryptase est le produit de sécrétion majoritairement libéré lors de la dégranulation mastocytaire et le PAR-2 est sa cible privilégiée dans le muscle lisse [257].

Cependant, l'implication potentielle du PAR-2 musculaire lisse dans le remodelage bronchique *in vitro* et *in vivo* n'est pas encore élucidée. D'une part, les CML d'asthmatiques sont caractérisées par un excès de prolifération [258, 259] dû à un excès de biogenèse mitochondriale [253] et d'autre part, la stimulation aiguë du PAR-2 par le peptide SLIGKV, augmente la prolifération des CML provenant de sujets témoins [93]. Aucune étude *in vitro* n'a confirmé les résultats de Knight et al *ex vivo*, à savoir qu'il n'y a pas de différence d'expression du PAR-2 entre le muscle lisse bronchique des témoins et celui des asthmatiques [176]. Nous ne disposons pas non plus d'arguments directs pour affirmer l'implication du PAR-2 dans l'excès de prolifération observé chez l'asthmatique. Les objectifs de ce deuxième travail ont donc été dans un premier temps, d'évaluer l'expression du PAR-2 dans les CML d'asthmatiques *in vitro* et dans un second temps, d'étudier les effets d'une stimulation chronique du PAR-2, sur la réponse calcique et la prolifération des CML.

Article n°2:

Protease activated receptor-2 expression and function in asthmatic bronchial smooth muscle

Benoit Allard *, Imane Bara *, Guillaume Gilbert, Gabrielle Carvalho, Thomas Trian,
Annaig Ozier, Jennifer Gillibert-Duplantier, Olga Ousova, Elise Maurat, Jean-François
Quignard, Pierre-Olivier Girodet, Roger Marthan, and Patrick Berger

(* participation équivalente)

(En révision favorable à Plos One, 2013)

Protease activated receptor-2 expression and function in asthmatic bronchial smooth muscle

Benoit Allard ^{*1,2}, Imane Bara ^{*1,2}, Guillaume Gilbert^{1,2}, Gabrielle Carvalho^{1,2}, Thomas Trian^{1,2}, Annaig Ozier^{1,2,3}, Jennifer Gillibert-Duplantier^{1,2}, Olga Ousova^{1,2}, Elise Maurat^{1,2}, Matthieu Thumerel^{1,2,3}, Jean-François Quignard^{1,2}, Pierre-Olivier Girodet^{1,2,3}, Roger Marthan^{1,2,3}, and Patrick Berger^{1,2,3}

* Authors contributed equally to this work

¹Univ- Bordeaux, Centre de Recherche Cardio-thoracique de Bordeaux, U1045, Département de Pharmacologie, CIC 0005, F-33000 Bordeaux, France

²INSERM, Centre de Recherche Cardio-thoracique de Bordeaux, U1045, CIC 0005, F-33000 Bordeaux, France

³CHU de Bordeaux, Service d'Exploration Fonctionnelle Respiratoire, CIC 0005, F-33604 Pessac, France

Corresponding author: Pr. Patrick Berger, Centre de Recherche Cardio-thoracique de Bordeaux, INSERM, U1045, Université Bordeaux Segalen, 146 rue Léo Saignat. 33076 Bordeaux Cedex, France. Telephone: 33 5 57 57 16 94 Fax: 33 5 57 57 16 95

E-mail: patrick.berger@u-bordeaux2.fr

Competing Interests

"Patrick Berger has read the journal's policy and has the following conflicts: board member (Novartis, GSK), Research grants (Novartis, GSK), honoraria for speaking (Novartis, Chiesi, GSK, Astra-Zeneca, Schering Plough, Takeda). The other authors have declared that no competing interests exist. This does not alter our adherence to all the PLOS ONE policies on sharing data and materials."

Abstract

Asthmatic bronchial smooth muscle (BSM) is characterized by structural remodeling associated with mast cell infiltration displaying features of chronic degranulation. Mast cell-derived tryptase can activate protease activated receptor type-2 (PAR-2) of BSM cells. The aims of the present study were (i) to evaluate the expression of PAR-2 in both asthmatic and non asthmatic BSM cells and, (ii) to analyze the effect of prolonged stimulation of PAR-2 in asthmatic BSM cells on cell signaling and proliferation.

BSM cells were obtained from both 33 control subjects and 22 asthmatic patients. PAR-2 expression was assessed by flow cytometry, western blot and quantitative RT-PCR. Calcium response, transduction pathways and proliferation were evaluated before and following PAR-2 stimulation by SLIGKV-NH₂ or trypsin for 1 to 3 days.

Asthmatic BSM cells expressed higher basal levels of functional PAR-2 compared to controls in terms of mRNA, protein expression and calcium response. When PAR-2 expression was increased by means of lentivirus in control BSM cells to a level similar to that of asthmatic cells, PAR-2-induced calcium response was then similar in both types of cell. However, repeated PAR-2 stimulations increased the proliferation of asthmatic BSM cells but not that of control BSM cells even following lentiviral over-expression of PAR-2. Such an increased proliferation was related to an increased phosphorylation of ERK in asthmatic BSM cells.

In conclusion, we have demonstrated that asthmatic BSM cells express increased baseline levels of functional PAR-2. This higher basal level of PAR-2 accounts for the increased calcium response to PAR-2 stimulation, whereas the increased proliferation to repeated PAR-2 stimulation is related to increased ERK phosphorylation.

Introduction

Asthma is a chronic inflammatory disease characterized by bronchial hyperresponsiveness and airway remodeling [1]. Regarding bronchial hyperresponsiveness, the role of a specific increase in the number of mast cells infiltrating the bronchial smooth muscle (BSM) of asthmatics has been put forward [2]. The mechanisms of such mast cell myositis involve a direct chemotactic activity of BSM cells through the production of various cytokines and chemokines, including TGF- β 1 [3], CXCL10 [4], and CX₃CL1 [5]. Moreover, mast cell can adhere to BSM cell by both cell-cell [6] and cell-extra cellular matrix-cell interactions [7]. Features of chronic mast cell degranulation are also present within the asthmatic BSM [8]. Mast cells produce a number of potent mediators, the most abundant of which is the serine protease tryptase (EC 3.4.21.59) [9]. Tryptase has been shown to activate protease activated receptors (PAR) that are expressed at the site of the BSM [10]. Among these receptors, the subtype 2 (PAR-2), plays a major role in bronchial hyperresponsiveness [11], and BSM cell calcium rise [12,13], as evidenced by pharmacological and RNA interference tools [13]. Taken together, all these findings suggest the presence of an auto-activation loop in asthma, involving mast cells and their mediators including tryptase. Mast cells chronically stimulate PAR-2 in BSM cell inducing bronchial hyperresponsiveness and chemotactic activity, which in turn recruits new mast cells [3].

Regarding airway remodeling, a variety of studies have shown that BSM mass is increased, particularly in severe asthma [14,15]. Such an increased BSM mass has been associated with a decrease in lung function [15,16], and related with an increased BSM cell proliferation [15] through a mitochondrial-dependent pathway both *in vitro* and *ex vivo* [14]. As for bronchial hyperresponsiveness, PAR agonists, such as tryptase [17] or YKL-40 [18] have been shown to induce BSM cell proliferation *in vitro* mediated by the subtype PAR-2, as demonstrated by

pharmacological and RNA interference tools [17,18]. However, the potential role of PAR-2 in airway remodeling remains largely unknown in asthma. Indeed, whereas the proliferation of asthmatic BSM cells to a wide range of growth factors, present in fetal calf serum, is increased as compared to that of non asthmatic BSM cells *in vitro* [14,19,20], the proliferative response to a single stimulation of PAR-2 by a specific agonist, such as YKL-40, remains unchanged [18]. Moreover, the effect of repeated PAR-2 stimulation on asthmatic BSM cells, a condition that more closely mimics the clinical situation, remains unknown. In addition, in mild to moderate asthmatic bronchi, PAR-2 expression is increased within the epithelium, whereas that in BSM appears unchanged [21]. Nevertheless, the expression of PAR-2 in the BSM remains unknown both in severe asthma *ex vivo* and in all asthmatics *in vitro*.

Therefore, in the present study, both asthmatic and non asthmatic BSM cells were used *in vitro* to evaluate the expression of PAR-2 and the effect of its prolonged stimulation on both calcium and proliferative responses. We found that, asthmatic BSM cells expressed increased baseline levels of functional PAR-2 compared to control BSM cells and that, repeated PAR-2 stimulations increased BSM cell proliferation from asthmatics only, through an ERK-dependent pathway.

Materials and Methods

Ethics statement

All patients gave their written informed consent to participate to the study, after the nature of the procedure had been fully explained. The study followed recommendations outlined in the Helsinki Declaration and received the approval from the local ethics committee (“CPP Sud-Ouest et Outre mer IV”).

Study populations

A total of 22 patients with mild to severe persistent asthma, and 33 non asthmatics were prospectively recruited from the “Centre Hospitalier Universitaire (CHU)” of Bordeaux according to Global Initiative for Asthma criteria [22]. Bronchial specimens were obtained by either fiberoptic bronchoscopy or lobectomy, as previously described [14,18] (See Table 1 for patients’ characteristics).

Cell culture

Human BSM cells were derived from bronchial specimens, as previously described [14,18]. Cell purity was assessed by both immunocytochemistry and flow cytometry (Figure S1), on growth arrested cells using serum-free DMEM (PAN Biotech, Brumath, France) for 48 h [18]. All experiments were performed on phenotypically confirmed BSM cells between passages 2 and 5 [14]. For each experiment, BSM cells originating from the same passage were used in both asthmatic and non asthmatic subjects.

A synthetic peptide with a sequence corresponding to the tethered ligand domain of PAR-2 (SLIGKV in humans) has been employed to experimentally activate PAR-2 without proteolytic cleavage [12,17]. We also used the reverse peptide VKGILS-NH₂ as negative control for SLIGKV-NH₂ experiments (PolyPeptide Group, Strasbourg, France). Both SLIGKV-NH₂ and VKGILS-NH₂ were used on growth arrested BSM cells at 10⁻⁴ M and, were changed every 24 h for 1 to 3 days for proliferation, PAR-2 expression, cell transduction and calcium experiments. PAR-2 expression was assessed by flow cytometry, western blot and quantitative RT-PCR as described previously [13,18].

Lentivirus over-expressing PAR-2

The genomic library clone IRATp970H0715D (Source BioScience Lifesciences, Nottingham, United Kingdom), containing PAR-2 ORF cDNA was used to amplify the coding sequence of the gene. The obtained PCR fragment was then cloned into a transfer lentiviral plasmid containing a GFP reporter gene (Plate-forme de vectorologie SFR TransBioMed, Univ Bordeaux, France). As described previously, 3 plasmids were then co-transfected in human embryonic kidney cells (293T) to produce replication-deficient lentiviral particles [18].

Microspectrofluorimetric measurement of cytosolic calcium

The Ca²⁺-sensitive fluorescent probe indo-1 was used to record changes in intracellular calcium concentration ([Ca²⁺]_i) in BSM cells, as previously described [12,13] following stimulation with SLIGKV-NH₂.

Cell proliferation

Cell proliferation was evaluated using BrdU incorporation, as previously described [17,18] following stimulation with either SLIGKV-NH₂ or VKGILS-NH₂, for 1 to 3 days.

Cell transduction

AKT, ERK and p38 phosphorylation were analyzed following 1 to 3 days challenge with SLIGKV-NH₂, using western blot, as described previously [18,23].

Mitochondrial mass was assessed by the porin content using western blot, and mitochondrial biogenesis was assessed by peroxysome proliferator-activated receptor γ co-activator-1 α (PGC-1 α), nuclear respiratory factor-1 (NRF-1) and mitochondrial transcription factor A (TFAM) contents using both quantitative RT-PCR and western blot, as previously described [14].

Statistical analysis

The statistical analysis was performed with NCSS software (NCSS 1997®; NCSS Statistical software, Kaysville, Utah). Values are presented as the mean \pm SD or SEM. Statistical significance was analyzed by paired Wilcoxon-rank tests and Mann & Whitney tests. A p value < 0.05 was considered statistically significant.

Results

Asthmatic BSM cells express increased baseline levels of functional PAR-2

PAR-2 expression was measured in BSM cells at both protein and mRNA levels. Using flow cytometry, PAR-2 surface expression was increased in asthmatic BSM cells compared to controls (Mean fluorescence intensity: $2.3 \times 10^4 \pm 0.9$ vs. $0.3 \times 10^4 \pm 0.2$, respectively) (Figure 1A). Moreover, the total PAR-2 protein and mRNA expressions were also increased in asthmatic BSM cells compared to controls using western blot (Figure 1B) and quantitative RT-PCR (Figure 1C), respectively. Similar findings were observed in growth arrested BSM cells, as well as, in BSM cells from passages 2 to 5 (data not shown).

To determine whether PAR-2 was functional in control and asthmatic BSM cells, we measured PAR-2 induced $[Ca^{2+}]_i$ rise in growth arrested cells following SLIGKV-NH₂ (Figure 2A). Basal $[Ca^{2+}]_i$ was similar in asthmatic and control BSM cells (Figure 2B). We checked that the calcium concentration was stable for at least 60 sec, under baseline condition (Figure S2A). The calcium variation, under this unstimulated condition, was also similar in asthmatic and control BSM cells (Figure S2B). However, calcium peak induced by the PAR-2 agonist peptide SLIGKV-NH₂ was significantly increased in asthmatic BSM cells compared to controls (160 ± 8 vs. 100 ± 8 delta ratio $\lambda_{405}/\lambda_{480}$ (x1000), respectively) (Figure 2C). Similarly, the area under the calcium curves was also significantly greater in asthmatic than in control cells (Figure 2D). Moreover, the activation of PAR-2 by trypsin induced similar results (Figure S3). Conversely, the effect of the reverse peptide VKGILS-NH₂, which does not activate PAR-2, was unchanged in asthmatic compared to control cells (Figure S2C).

PAR-2 lentiviral over expression enhances PAR-2 calcium response in control BSM cells

To confirm the role of higher basal levels of PAR-2 in the increased calcium response observed in asthmatic BSM cells, we used a lentiviral strategy designed to enhance PAR-2 expression in control cells. We first verified lentiviral efficacy using quantitative RT-PCR and flow cytometry. Transduction of control BSM cells with lentiviral PAR-2 particles dramatically increased the transcription of PAR-2 (data not shown). The expression of lentiviral particles was additionally assessed by the presence of GFP in more than 82% of transduced BSM cells (data not shown). Quantitatively, using flow cytometry, we verified that PAR-2 protein expression was increased in these transduced control BSM cells to a level similar to that of asthmatic cells (Figure 3A). We then assessed the functional consequences of this lentiviral PAR-2 over-expression on calcium response. SLIGKV-induced $[Ca^{2+}]_i$ response was significantly enhanced in control BSM cells with lentiviral PAR-2 over-expression compared to control BSM cells transduced with control lentiviral particles (Figure 3B & C). The observed calcium response was similar to that of asthmatic BSM cells, which expressed increased baseline levels of PAR-2 (Figure 3B & C). Moreover, the pattern of PAR-2-induced calcium response upon activation by trypsin was similar to that observed upon activation by SLIGKV-NH₂ (Figure S3). As previously observed, the effect of the reverse peptide VKGILS-NH₂ remained unchanged in control BSM cells with lentiviral PAR-2 over-expression compared to control BSM cells transduced with control lentiviral particles (data not shown) and similar to that under unstimulated condition (Figure S2B).

Asthmatic BSM cell proliferation is enhanced following PAR-2 stimulation through an ERK-dependent pathway

We evaluated the proliferation of asthmatic and control BSM cells upon PAR-2 stimulation. Proliferation of asthmatic BSM cells was significantly enhanced following 3 days of stimulation with SLIGKV-NH₂ (Figure 4A) or trypsin (Figure S4) compared to both control cells and asthmatic BSM cells following 1 day of stimulation. Moreover, PAR-2 expression was increased in asthmatic BSM cells following 3 days of stimulation with SLIGKV-NH₂ compared to both control cells and asthmatic BSM cells following 1 day of stimulation (Figure 4B). In contrast, PAR-2-dependent calcium response, following 3 days of stimulation with SLIGKV-NH₂ or trypsin, remained similar in terms of both calcium peak (Figure 4C or Figure S5) and area under the curve (data not shown) to that following 1 day of stimulation in both types of BSM. In addition, SLIGKV-NH₂ or trypsin failed to increase proliferation in control BSM cells over-expressing PAR-2 (Figure 4D or Figure S4), suggesting that additional pathways are specifically involved in asthmatic BSM cells that account for the increased proliferation. Indeed, the EC₅₀ of SLIGKV-NH₂ for cell proliferation was similar in control BSM cells i.e. 2.7×10^{-6} M (1.2; 6.0), in control BSM cells over-expressing PAR-2 i.e. 3.6×10^{-6} M (0.5; 23.8) and in asthmatic BSM cells i.e. 1.7×10^{-6} M (0.2; 11.4) (with values presented as means (n=5 controls and n=6 asthmatics) with 95% confidence limits in parentheses, $p > 0.05$ using Wilcoxon rank test and Mann & Whitney test). Along the same line, lentiviral PAR-2 over-expression in control BSM cells did not increase either mitochondrial mass (Figure S6A) or mitochondrial biogenesis assessed by the levels of TFAM at both protein (Figure S6B) and mRNA levels (Figure S6C). Moreover, the level of the upstream transcription factors (*i.e.*, NRF-1 and PGC-1 α) was not altered in this experimental condition (data not shown).

We then evaluated the phosphorylation of various PAR-2-dependent transductions pathways (*i.e.* ERK, p38 and AKT) using western blot. Phosphorylation of ERK was significantly increased in asthmatic BSM cells following 3 days of stimulation with SLIGKV-NH₂ compared to asthmatic BSM cells either un-stimulated or stimulated for 1 day (Figure 5A and Figure S7A). The role of ERK phosphorylation was confirmed by the significant effect of ERK inhibitor PD98059 (Figure Figure S8). Conversely, 3 days of stimulation of control BSM cells did not alter ERK phosphorylation. Regarding the role of p38, on the one hand, its phosphorylation was significantly increased in both asthmatic and non asthmatic BSM cells following 3 days of stimulation with SLIGKV-NH₂ (Figure 5B and Figure S7B), but, on the other hand, the p38 inhibitor SB203580 was unable to decrease PAR-2 dependent BSM cell proliferation (Figure S8). Finally, the phosphorylation of AKT was unchanged in both asthmatic and control BSM cells (data not shown).

Discussion

In this study, we have demonstrated, for the first time that asthmatic BSM cells express increased baseline levels of functional PAR-2. These higher basal levels of PAR-2 account for the increased calcium response to PAR-2 stimulation, whereas the increased proliferation to repeated PAR-2 stimulations is related to increased ERK phosphorylation.

Regarding the level of PAR-2 in asthmatic BSM cells, this is the first study demonstrating an increased expression *in vitro*. A previous study performed *ex vivo* in mild to moderate asthmatics reported an increased PAR-2 expression within the epithelium but not in BSM [21]. In this study, patients with various asthma severities have been included and primary cultured BSM cells from these patients consistently exhibited higher basal levels of PAR-2. However, it should be noted that non asthmatics appeared to be older with higher male to female ratio and higher smoker to never smoker ratio as compared to asthmatics. These differences could be confounding factors in our study. These increased baseline levels of PAR-2 have been measured at both protein and mRNA levels. We did not find any significant correlation between PAR-2 expression and asthma severity. However, the study has not been enough powered to perform such correlation analysis. We paid a special attention to avoid cell culture artifacts. Indeed, similar PAR-2 expression was found in BSM cells from various passages in both FCS and serum deprived culture medium. However, repeated PAR-2 stimulations with SLIGKV-NH₂ for 3 days was able to further increase PAR-2 expression only within asthmatic BSM cells. Nevertheless, an additional study is required to completely avoid cell culture artifacts. Such a study should evaluate the BSM PAR-2 expression *ex vivo* in a large cohort of asthmatic patients with various severities.

Several studies have shown that asthmatic BSM cell proliferation is increased in response to FCS [14,19,20]. However, when looking at the proliferative response to specific agonists such as YKL-40 or PDGF, we previously demonstrated that the proliferation is similar in asthmatic and non asthmatic BSM cells [18]. In the present study, as in that previously published [18], we observed that the proliferation induced by a single stimulation with the PAR-2 agonist peptide SLIGKV-NH₂ is similar in asthmatic and non asthmatic BSM cells. To further analyze this discrepancy, we have examined the effect of repeated stimulations with SLIGKV-NH₂ for 3 days and observed that, under such conditions, the proliferation was increased only in asthmatic BSM cells. This increased BSM cell proliferation has been associated with a concomitant increased PAR-2 expression within asthmatic BSM cells. Since it has been previously demonstrated that PAR-2 desensitized quickly in BSM cells [12,24], in the present study, the agonist peptide SLIGKV-NH₂ was renewed every 24h, which is largely enough to allow SLIGKV-NH₂ to be degraded in the culture medium and new PAR-2 to be synthesized and localized at the plasma membrane of BSM cells [25,26]. As a consequence, calcium responses, induced by a short stimulation with SLIGKV-NH₂, were similar in BSM cells after 1 day or 3 days of chronic stimulation with the same agonist peptide, suggesting that desensitization did not occur under these experimental conditions. We do believe that repeated *in vitro* stimulations more likely correspond to the *in vivo* chronic PAR-2 stimulation. Indeed, we have previously observed *ex vivo* typical features of mast cell degranulation within the asthmatic BSM layer [8].

We have previously demonstrated that, in severe asthmatic BSM, the increased FCS-induced BSM cell proliferation is related to an altered calcium signaling through an abnormal extra-cellular calcium entry [14]. Subsequently, Mahn *et al.* demonstrated that, the expression of the

sarco/endoplasmic reticulum calcium pump (*i.e.*, SERCA2) is decreased in the BSM from moderate asthmatics [27]. Moreover, knocking down SERCA2 increased non asthmatic BSM cell proliferation [27]. These two studies strongly argue in favor of a direct relationship between calcium response and BSM cell proliferation induced by FCS. In the present study, both PAR-2-dependent calcium response and cell proliferation were increased in asthmatic BSM cells. However, whereas PAR-2 over-expression reproduced the increased calcium response to SLIGKV-NH₂ in non asthmatic BSM cells, it failed to increase BSM cell proliferation. These results suggest that, the sole over-expression of a receptor coupled to calcium signaling is not enough to increase BSM cell proliferation. This lack of proliferative effect of PAR-2 over-expression was not due to a difference in either the EC₅₀ of SLIGKV-NH₂ or the level of PAR-2 expression. Indeed, we paid a special attention to optimize the experimental conditions, in order to obtain a similar PAR-2 expression level in non asthmatic BSM cells following lentiviral transduction to that in asthmatic BSM cells. Alternatively, one may suggest that, this lack of proliferative effect could be related to a non specific effect of lentivirus following transduction. This is unlikely since, our data were always compared to those obtained in response to a control lentivirus only lacking PAR-2 cDNA. In addition, this control lentivirus altered neither the calcium response nor the proliferation rate compared to non infected BSM cells. Moreover, since lentiviruses induce a stable protein expression, experiments were performed long time after the stress of transduction (*i.e.*, 7 days later).

Since PAR-2 dependent increased asthmatic BSM cell proliferation was not reproduced by lentiviral PAR-2 over-expression in control BSM cells despite the similar effect on calcium signaling, we also examined PAR-2 downstream signaling transduction pathways. The phosphorylation of ERK appears to be involved since the increased amount of phospho-ERK was

restricted to asthmatic BSM cells and, its inhibition by PD98059 inhibited PAR-2 dependent asthmatic BSM cell proliferation. In contrast, the role of p38 could not be demonstrated since, increased amount of phospho-p38 was observed in both asthmatic and non asthmatic BSM cells and, its inhibition by SB203580 did not decrease PAR-2 dependent asthmatic BSM cell proliferation. The current results also point out a striking difference between, asthmatic BSM cells with higher basal levels of PAR-2 and, lentiviral-induced PAR-2 over-expression in non asthmatic BSM cells. Indeed, we have previously demonstrated that, in severe asthmatic BSM, the increased FCS-induced cell proliferation is related to an increased mitochondrial biogenesis [14], which was not found in non asthmatic BSM cells with lentiviral-induced PAR-2 over-expression.

In conclusion, asthmatic BSM cells are characterized by an increased expression of functional PAR-2, the prolonged stimulation of which may contribute to many pathophysiological patterns present in asthma such as bronchial hyperresponsiveness and BSM remodeling. However, the higher basal levels of PAR-2 account for the increased calcium response but are not sufficient to explain increased BSM cell proliferation, which needs the additional up-regulation of ERK phosphorylation. Blocking BSM PAR-2 and/or its transduction pathways could be interesting and promising targets for therapeutic intervention in asthma.

Supporting Information

This article has an online Supplemental Materials and Methods, and Supplemental Figures.

Acknowledgement

The authors thank the staff of “Service de Chirurgie Thoracique” for the supply of human lung tissue, the vectorology and flow cytometry platforms (SFR Transbiomed, University of Bordeaux) for technical assistance and Thomas Royo-Lazaro from CIC0005.

References

1. Bara I, Ozier A, Tunon de Lara JM, Marthan R, Berger P (2010) Pathophysiology of bronchial smooth muscle remodelling in asthma. *Eur Respir J* 36: 1174-1184.
2. Brightling CE, Bradding P, Symon FA, Holgate ST, Wardlaw AJ, et al. (2002) Mast-cell infiltration of airway smooth muscle in asthma. *N Engl J Med* 346: 1699-1705.
3. Berger P, Girodet PO, Begueret H, Ousova O, Perng DW, et al. (2003) Tryptase-stimulated human airway smooth muscle cells induce cytokine synthesis and mast cell chemotaxis. *Faseb J* 17: 2139-2141.
4. Brightling CE, Ammit AJ, Kaur D, Black JL, Wardlaw AJ, et al. (2005) The CXCL10/CXCR3 axis mediates human lung mast cell migration to asthmatic airway smooth muscle. *Am J Respir Crit Care Med* 171: 1103-1108.
5. El-Shazly A, Berger P, Girodet PO, Ousova O, Fayon M, et al. (2006) Fraktalkine produced by airway smooth muscle cells contributes to mast cell recruitment in asthma. *J Immunol* 176: 1860-1868.
6. Yang W, Kaur D, Okayama Y, Ito A, Wardlaw AJ, et al. (2006) Human lung mast cells adhere to human airway smooth muscle, in part, via tumor suppressor in lung cancer-1. *J Immunol* 176: 1238-1243.
7. Girodet PO, Ozier A, Trian T, Begueret H, Ousova O, et al. (2010) Mast cell adhesion to bronchial smooth muscle in asthma specifically depends on CD51 and CD44 variant 6. *Allergy* 65: 1004-1012.
8. Begueret H, Berger P, Vernejoux JM, Dubuisson L, Marthan R, et al. (2007) Inflammation of bronchial smooth muscle in allergic asthma. *Thorax* 62: 8-15.

9. Walls AF, Jones DB, Williams JH, Church MK, Holgate ST (1990) Immunohistochemical identification of mast cells in formaldehyde-fixed tissue using monoclonal antibodies specific for tryptase. *J Pathol* 162: 119-126.
10. Tran T, Stewart AG (2003) Protease-activated receptor (PAR)-independent growth and pro-inflammatory actions of thrombin on human cultured airway smooth muscle. *Br J Pharmacol* 138: 865-875.
11. Berger P, Compton SJ, Molimard M, Walls AF, N'Guyen C, et al. (1999) Mast cell tryptase as a mediator of hyperresponsiveness in human isolated bronchi. *Clin Exp Allergy* 29: 804-812.
12. Berger P, Tunon-De-Lara JM, Savineau JP, Marthan R (2001) Selected contribution: tryptase-induced PAR-2-mediated Ca(2+) signaling in human airway smooth muscle cells. *J Appl Physiol* 91: 995-1003.
13. Trian T, Girodet PO, Ousova O, Marthan R, Tunon-de-Lara JM, et al. (2006) RNA interference decreases PAR-2 expression and function in human airway smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 34: 49-55.
14. Trian T, Benard G, Begueret H, Rossignol R, Girodet PO, et al. (2007) Bronchial smooth muscle remodeling involves calcium-dependent enhanced mitochondrial biogenesis in asthma. *J Exp Med* 204: 3173-3181.
15. Ramos-Barbon D, Fraga-Iriso R, Brienza NS, Montero-Martinez C, Vereza-Hernando H, et al. (2010) T Cells localize with proliferating smooth muscle alpha-actin+ cell compartments in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 182: 317-324.
16. Kaminska M, Foley S, Maghni K, Storness-Bliss C, Coxson H, et al. (2009) Airway remodeling in subjects with severe asthma with or without chronic persistent airflow obstruction. *J Allergy Clin Immunol* 124: 45-51.

17. Berger P, Perng DW, Thabrew H, Compton SJ, Cairns JA, et al. (2001) Tryptase and agonists of PAR-2 induce the proliferation of human airway smooth muscle cells. *J Appl Physiol* 91: 1372-1379.
18. Bara I, Ozier A, Girodet PO, Carvalho G, Cattiaux J, et al. (2012) Role of YKL-40 in bronchial smooth muscle remodeling in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 185: 715-722.
19. Johnson PR, Black JL, Carlin S, Ge Q, Underwood PA (2000) The production of extracellular matrix proteins by human passively sensitized airway smooth-muscle cells in culture: the effect of beclomethasone. *Am J Respir Crit Care Med* 162: 2145-2151.
20. Roth M, Johnson PR, Borger P, Bihl MP, Rudiger JJ, et al. (2004) Dysfunctional interaction of C/EBPalpha and the glucocorticoid receptor in asthmatic bronchial smooth-muscle cells. *N Engl J Med* 351: 560-574.
21. Knight DA, Lim S, Scaffidi AK, Roche N, Chung KF, et al. (2001) Protease-activated receptors in human airways: upregulation of PAR-2 in respiratory epithelium from patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 108: 797-803.
22. GINA Global Strategy for Asthma Management and Prevention, Global Initiative for Asthma (GINA). (2012). Available from: <http://www.ginasthma.org>.
23. Carvalho G, Poalas K, Demian C, Hatchi E, Vazquez A, et al. (2011) Participation of the cell polarity protein PALS1 to T-cell receptor-mediated NF-kappaB activation. *PLoS One* 6.
24. Chambers LS, Black JL, Poronnik P, Johnson PR (2001) Functional effects of protease-activated receptor-2 stimulation on human airway smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 281: L1369-1378.
25. Hamilton JR, Chow JM, Cocks TM (1999) Protease-activated receptor-2 turnover stimulated independently of receptor activation in porcine coronary endothelial cells. *Br J Pharmacol* 127: 617-622.

26. Nystedt S, Ramakrishnan V, Sundelin J (1996) The proteinase-activated receptor 2 is induced by inflammatory mediators in human endothelial cells. Comparison with the thrombin receptor. *J Biol Chem* 271: 14910-14915.
27. Mahn K, Hirst SJ, Ying S, Holt MR, Lavender P, et al. (2009) Diminished sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase (SERCA) expression contributes to airway remodelling in bronchial asthma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 10775-10780.

Figure legends

Figure 1. Increased PAR-2 expression in asthmatic bronchial smooth muscle cells.

PAR-2 levels were assessed by flow cytometry (A), western blot (B) and quantitative RT-PCR (C). Normalized median fluorescence intensities were calculated by dividing median fluorescence intensity of PAR-2 by that of isotype control (A). Representative blots stained with anti-PAR-2 or anti- β -actin antibodies are shown (B). The RT-PCR expression of PAR-2 was presented as an arbitrary unit and normalized to endogenous references (geometric averaging of three internal control genes; *i.e.* YWHAZ, HPRT-1, and PO) according to GeNorm (C). Bronchial smooth muscle cells were obtained from asthmatic (black bars, n=7) and control subjects (white bars, n=7). Results are expressed as mean \pm SD. * $P < 0.05$ using Mann & Whitney test.

Figure 2. Increased PAR-2 dependent calcium response in asthmatic bronchial smooth muscle cells.

Representative intracellular calcium responses following stimulation by 10^{-4} M SLIGKV-NH₂ for 30 sec are presented in bronchial smooth muscle cells from asthmatic (black line) or control subjects (grey line) (A). Basal calcium concentration (Basal $[Ca^{2+}]_i$, B), relative calcium response ($[Ca^{2+}]_i$ peak, C) and area under the curve (AUC $[Ca^{2+}]_i$, D) were assessed from cell response to 10^{-4} M SLIGKV-NH₂. Bronchial smooth muscle cells were obtained from asthmatic (black bars, n=3) and control subjects (white bars, n=3). Results are expressed as mean \pm SEM from a range of 14 to 41 cells per patient. * $P < 0.05$ using Mann & Whitney test.

Figure 3. Increased PAR-2 dependent calcium responses in control bronchial smooth muscle cells over-expressing PAR-2.

The effects of lentivirus over-expressing PAR-2 (squared bars) in control bronchial smooth muscle cells were evaluated as compared to both control bronchial smooth muscle cells transduced by control lentivirus (hatched bars) and non transduced asthmatic bronchial smooth muscle cells (black bars). PAR-2 surface protein expression was assessed by flow cytometry (A). Relative calcium response ($[Ca^{2+}]_i$ peak, B) and area under the curve (AUC $[Ca^{2+}]_i$, C) were assessed by microspectrofluorimetry from the cell response to 10^{-4} M SLIGKV-NH₂. Bronchial smooth muscle cells were obtained from asthmatic (black bars, n=3) and control subjects (white bars, n=3). Results are expressed as mean \pm SEM. Calcium responses were obtained from a range of 9 to 35 cells per patient. * $P < 0.05$ using paired Wilcoxon-rank tests and Mann & Whitney test.

Figure 4. Increased asthmatic bronchial smooth muscle cell proliferation following repeated PAR-2 stimulations.

Proliferation was measured using BrdU incorporation following stimulation for 1 or 3 days by 10^{-4} M SLIGKV-NH₂ or VKGILS-NH₂ (A). Bronchial smooth muscle cells were obtained from asthmatic (black bars, n=5) and control subjects (white bars, n=5). PAR-2 expression was assessed by flow cytometry following stimulation for 1 or 3 days by 10^{-4} M SLIGKV-NH₂ or VKGILS-NH₂ (B). Normalized median fluorescence intensities were calculated by dividing median fluorescence intensity of PAR-2 by that of isotype control. Bronchial smooth muscle cells were obtained from asthmatic (black bars, n=6) and control subjects (white bars, n=6). Relative

calcium response was assessed by microspectrofluorimetry from the cell response to 10^{-4} M SLIGKV-NH₂ following stimulation for 1 or 3 days by 10^{-4} M SLIGKV-NH₂ (C). Bronchial smooth muscle cells were obtained from asthmatic (black bars, n=3) and control subjects (white bars, n=3). Calcium responses were obtained from a range of 16 to 35 cells per patient. Proliferation was measured using BrdU incorporation following stimulation for 1 or 3 days by 10^{-4} M SLIGKV-NH₂ or VKGILS-NH₂ (D). Bronchial smooth muscle cells obtained from control subjects were transduced with control lentivirus (hatched bars, n=6) or lentivirus over-expressing PAR-2 (squared bars, n=6). Results are expressed as mean \pm SEM. * P < 0.05 using paired Wilcoxon-rank tests and Mann & Whitney tests.

Figure 5. Increased asthmatic bronchial smooth muscle cell phosphorylation of ERK and p38 following repeated PAR-2 stimulations.

Phosphorylation of ERK (A) and p38 (B) was measured using western blot following stimulation for 0, 1 or 3 days by 10^{-4} M SLIGKV-NH₂. Representative blots stained with anti-Phospho-ERK (P-ERK), anti-ERK, anti-Phospho-p38 (P-p38) and anti-p38 antibodies are shown. Bronchial smooth muscle cells were obtained from asthmatic (black bars, n=8) and control subjects (white bars, n=7). Results are expressed as mean \pm SD. * P < 0.05 using paired Wilcoxon-rank tests.

Figure S1. Bronchial smooth muscle cell phenotyping

Bronchial smooth muscle phenotype was assessed using both immunocytochemistry (A-F) and flow cytometry (G-H). Representative confocal microscopic images of cultured cells after 3-

dimensional reconstruction of 20 sections of 0.25 microns thick (original magnification, x600; scale bars = 20 μ m). Cells were obtained from a control subject (A, B and C) or an asthmatic patient (D, E and F). Cells were stained with anti-cytokeratin 18 (A and D), anti- α -smooth muscle actin (α -SM-actin, B and E) or anti-calponin (C and F) primary antibodies, and by appropriate secondary antibodies (Alexa Fluor 488). Nuclei were stained in blue with DAPI.

Representative flow cytometry histograms were obtained using bronchial smooth muscle cells from a control subject. α -smooth muscle-actin (G) or calponin (H) expression was assessed using irrelevant antibodies (gray lines) or specific antibodies (green lines).

Figure S2. Calcium responses under baseline and VKGILS stimulations

Representative intracellular calcium baselines are presented in bronchial smooth muscle cells from asthmatic (black line) or control subject (grey line) (A). Relative calcium response ($[Ca^{2+}]_i$ variations were assessed under baseline condition (B). The effects of lentivirus over-expressing PAR-2 (squared bars, n=4) in control bronchial smooth muscle cells were evaluated as compared to both control bronchial smooth muscle cells transduced by control lentivirus (hatched bars, n=4), control bronchial smooth muscle cells non transduced (white bars, n=4) and asthmatic bronchial smooth muscle cells (black bars, n=4). Results are expressed as mean \pm SEM from a range of 12 to 19 cells per patient. Representative intracellular calcium responses following stimulation by 10^{-4} M VKGILS-NH₂ for 30 sec are presented in bronchial smooth muscle cells from asthmatic (black line) or control subjects (grey line) (C). NS *P* non significant using Mann & Whitney test.

Figure S3. Increased trypsin-related calcium response in asthmatic bronchial smooth muscle cells

Representative intracellular calcium responses following stimulation by 3 U/ml trypsin for 30 sec are presented in asthmatic bronchial smooth muscle cells (bold black line), control bronchial smooth muscle cells (grey line) or control bronchial smooth muscle cells transduced with PAR-2 lentivirus (black line) (A). Basal calcium concentration (Basal $[Ca^{2+}]_i$, B), relative calcium response ($[Ca^{2+}]_i$ peak, C) and area under the curve (AUC $[Ca^{2+}]_i$, D) were assessed from cell response to 3 U/ml trypsin. Non transduced bronchial smooth muscle cells were obtained from asthmatic (black bars, n=4) and control subjects (white bars, n=4). PAR-2 lentivirus-transduced bronchial smooth muscle cells were obtained from control subjects (squared bars, n=4). Results are expressed as mean \pm SEM from a range of 22 to 46 cells per patient. * $P < 0.05$ using Mann & Whitney test.

Figure S4. Increased asthmatic bronchial smooth muscle cell proliferation following repeated PAR-2 stimulations with trypsin

Proliferation was measured using BrdU incorporation following stimulation for 1 or 3 days by 30 mU/ml trypsin. Bronchial smooth muscle cells were obtained from asthmatic (black bars, n=3) and control subjects (white bars, n=3). Bronchial smooth muscle cells obtained from control subjects were also transduced with lentivirus over-expressing PAR-2 (squared bars, n=3). Results are expressed as mean \pm SEM. * $P < 0.05$ using paired Wilcoxon-rank tests or Mann & Whitney tests.

Figure S5. Increased trypsin-related calcium response in asthmatic bronchial smooth muscle cells under repeated stimulations

Relative calcium response ($[Ca^{2+}]_i$ peak) were assessed by microspectrofluorimetry from the cell response to 3 U/ml trypsin after either 1 day stimulation or 3 days stimulation with 30 mU/ml trypsin. Bronchial smooth muscle cells were obtained from asthmatic (black bars, n=4) and control subjects (white bars, n=4). Results are expressed as mean \pm SEM. Calcium responses were obtained from a range of 20 to 40 cells per patient. * $P < 0.05$ using Mann & Whitney tests. NS non significant using paired Wilcoxon-rank tests.

Figure S6. Unaltered mitochondrial biogenesis in control bronchial smooth muscle cells over-expressing PAR-2.

The effects of lentivirus over expressing PAR-2 (squared bars) in control bronchial smooth muscle cells were compared to control bronchial smooth muscle cells transduced by control lentivirus (hatched bars). Porin level was assessed by western blot (A) and mitochondrial transcription factor A (TFAM) levels were assessed by both western blot (B) and quantitative RT-PCR (C). Representative blots stained with anti-porin, anti-TFAM or anti- β -actin antibodies are shown (A and B). Bronchial smooth muscle cells were obtained from control subjects (white bars, n=4 for A, B, n=6 for C). Results are expressed as mean \pm SEM. * $P < 0.05$ using paired Wilcoxon-rank tests.

Figure S7. Increased asthmatic bronchial smooth muscle cell phosphorylation of ERK and p38 following repeated PAR-2 stimulations.

Phosphorylation of ERK (A) and p38 (B) was measured using western blot following stimulation for 0, 1 or 3 days by 10^{-4} M SLIGKV-NH₂. Representative blots stained with anti-Phospho-ERK (P-ERK), anti-Phospho-p38 (P-p38) and anti- β -actin antibodies are shown. Bronchial smooth muscle cells were obtained from asthmatic (black bars, n=9) and control subjects (white bars, n=5). Results are expressed as mean \pm SD. * $P < 0.05$ using paired Wilcoxon-rank tests.

Figure S8. ERK inhibition decreased asthmatic bronchial smooth muscle cell proliferation following repeated PAR-2 stimulations

Cell proliferation was measured using BrdU incorporation following stimulation for 3 days by 10^{-4} M SLIGKV-NH₂ in the absence or in the presence of ERK inhibitor (PD 98059) or p38 inhibitor (SB 203580). Bronchial smooth muscle cells were obtained from asthmatic patients (black bars, n=4). Results are expressed as mean \pm SEM of percentage of cell proliferation in the absence of inhibitor. * $P < 0.05$ using paired Wilcoxon-rank tests.

TABLE 1. Clinical and functional characteristics of subjects

Characteristics	Non asthmatics	Asthmatics
No. of patients	33	22
Gender (M/F)	26 / 7	2 / 20
Age (yr)	61 ± 13	41 ± 17.5
Age range (yr)	19-79	19-72
BMI (kg/m ²)	26 ± 4.5	26 ± 6.5
Total serum IgE (kUI/L)	ND	473 ± 777
Allergic/Non allergic	0 / 33	17 / 5
Exacerbations (nb/yr)	ND	1 ± 1.4
Current treatment		
OCS (n)	0	2
ICS (n)	1	18
Dose of ICS	37 ± 193	1204 ± 877
LABA (n)	0	15
Smoking history		
Never (n)	8	19
Former (n)	10	3
Current (n)	15	0
Pack years	37 ± 28.4	0.7 ± 2.3
FEV ₁		
Liters	3.0 ± 0.6	2.5 ± 0.9
Percentage of predicted value	90.0 ± 14.2	84.3 ± 17.8
FEV ₁ : FVC ratio (% of FVC)	77 ± 6.8	72.7 ± 10.7
FEF ₂₅₋₇₅		
Liters sec ⁻¹	3 ± 0.9	2.2 ± 1.2
Percentage of predicted value	74 ± 26.8	57.5 ± 25.2

Data are mean ± SD. BMI: body mass index. OCS: oral corticosteroid. ICS: inhaled corticosteroid. LABA: long acting beta2 agonist. FEV₁: forced expiratory volume in one second. FVC: forced vital capacity. FEF₂₅₋₇₅: forced expiratory flow between 25 and 75% of FVC.

Figure 1

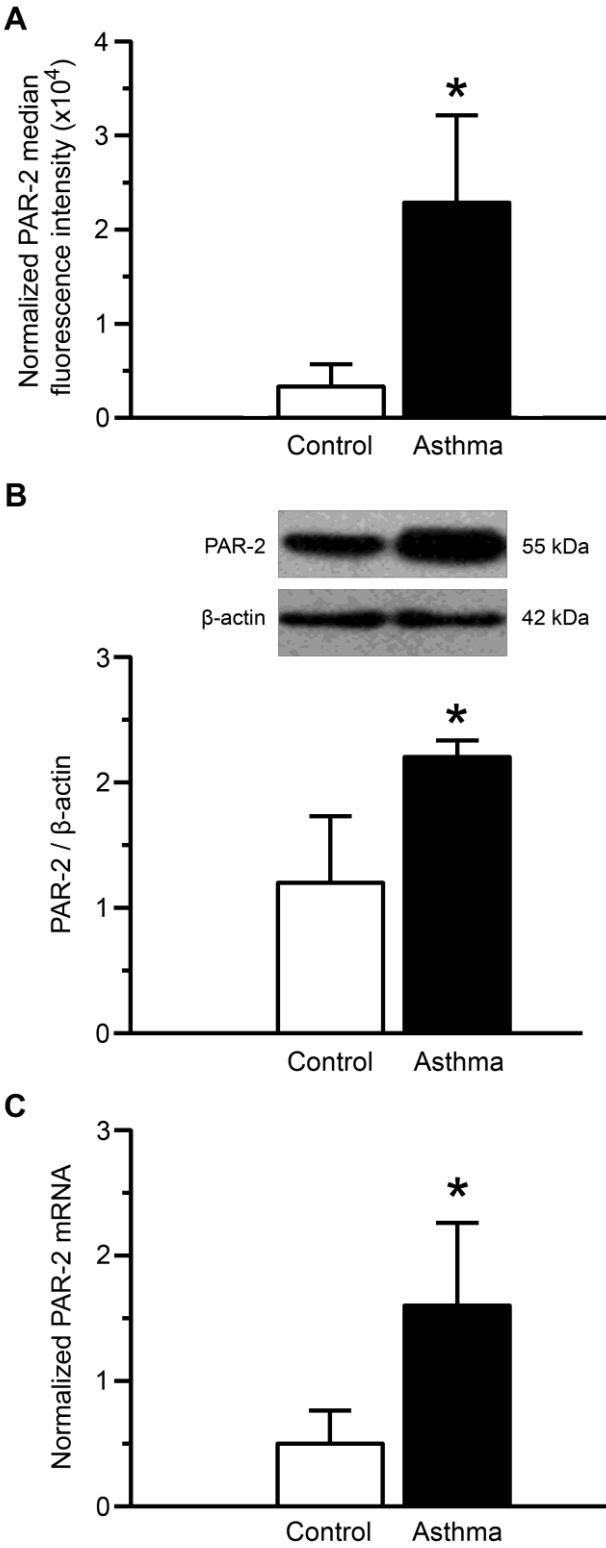


Figure 2

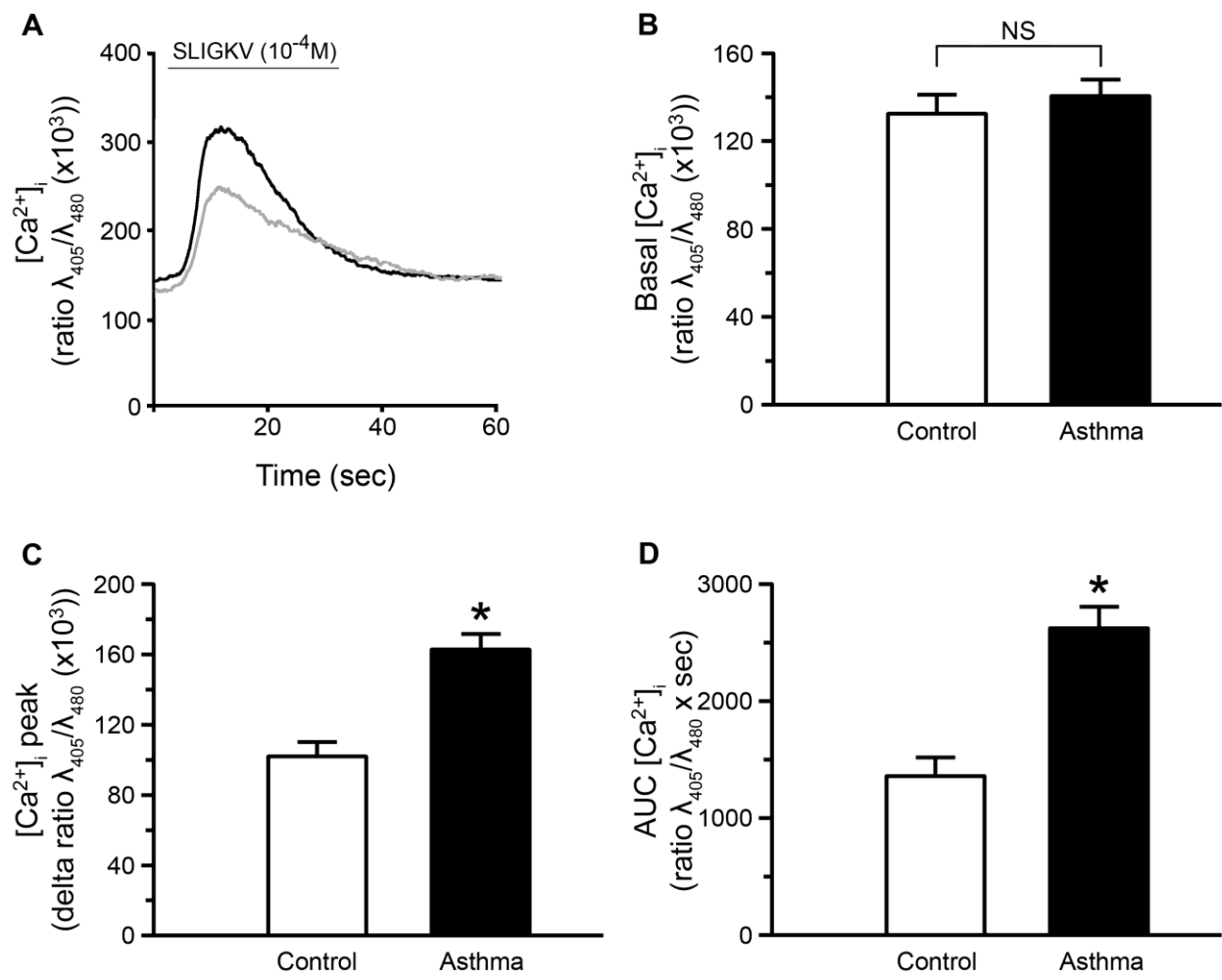


Figure 3

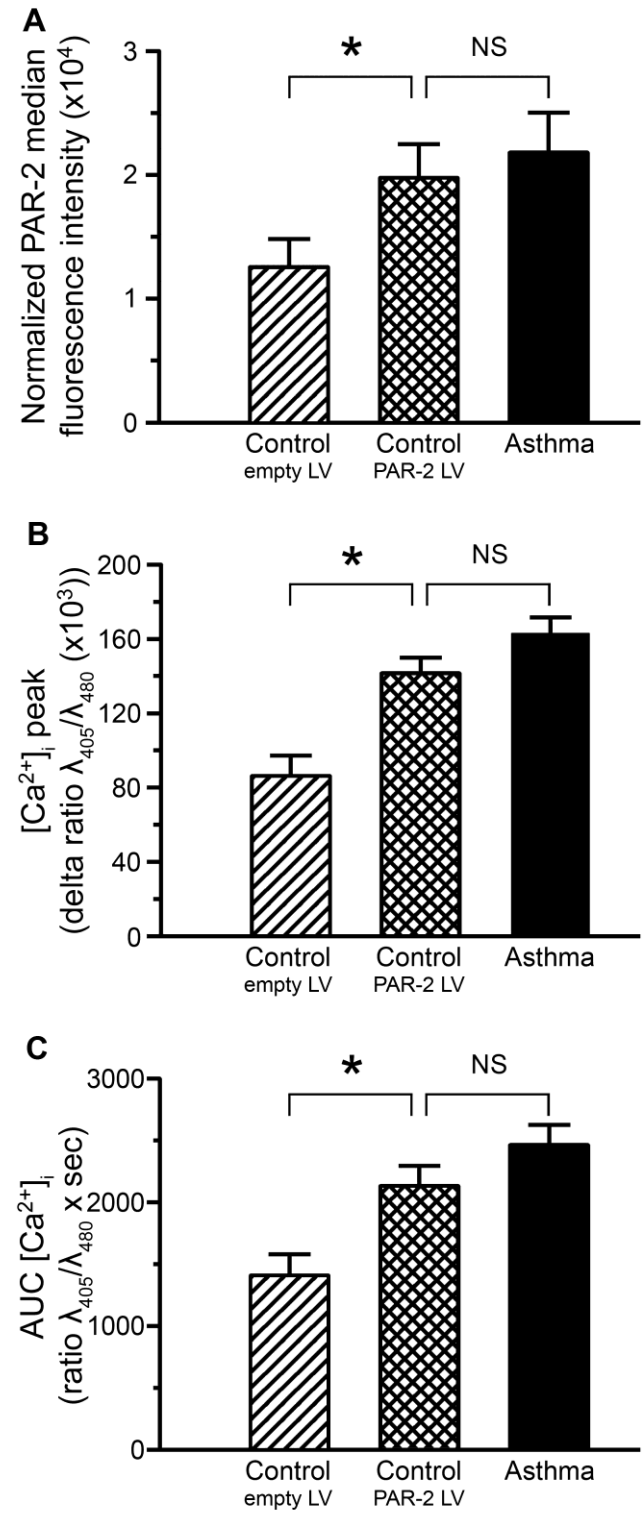


Figure 4

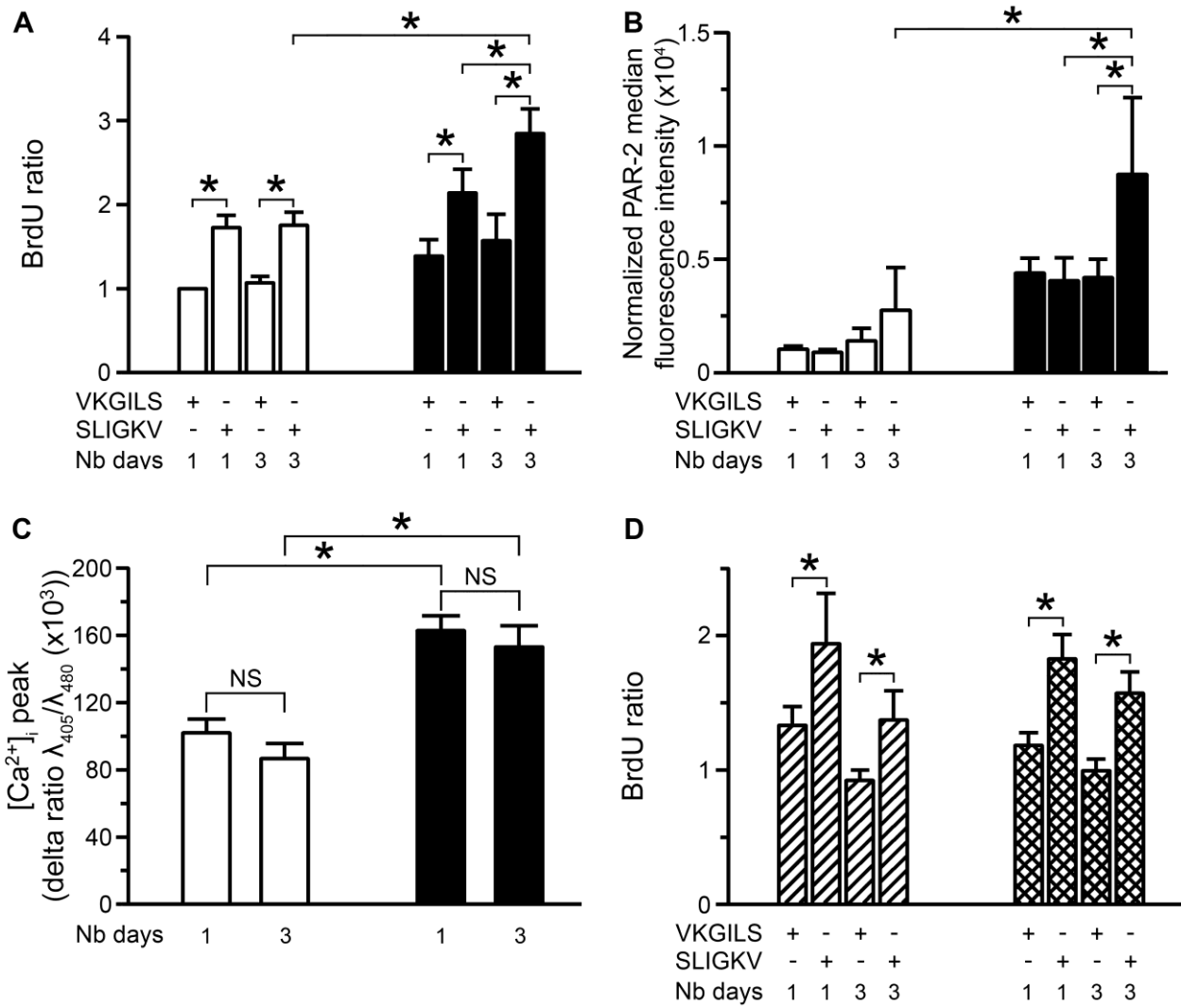


Figure 5

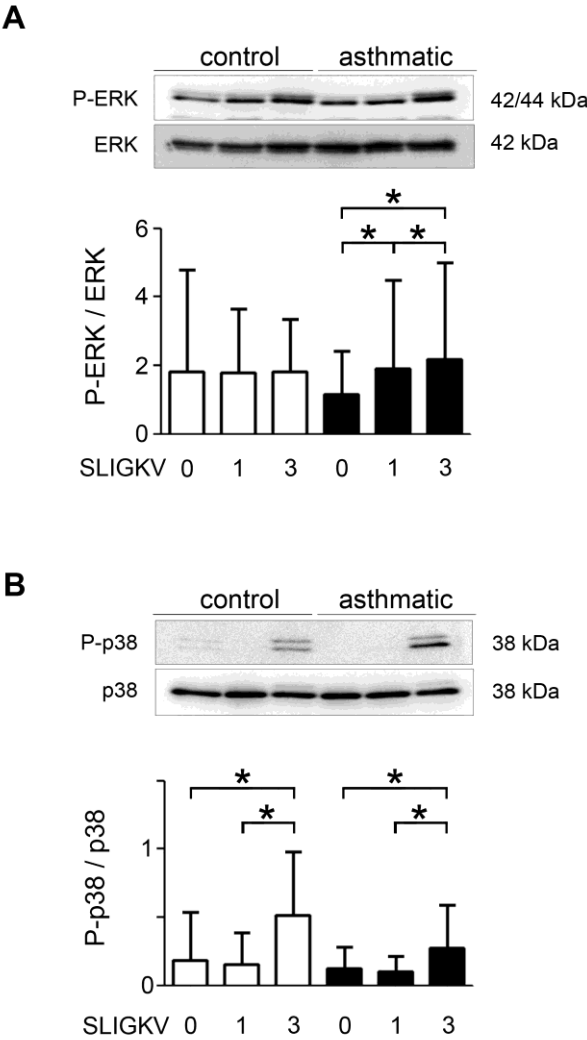


Figure S1

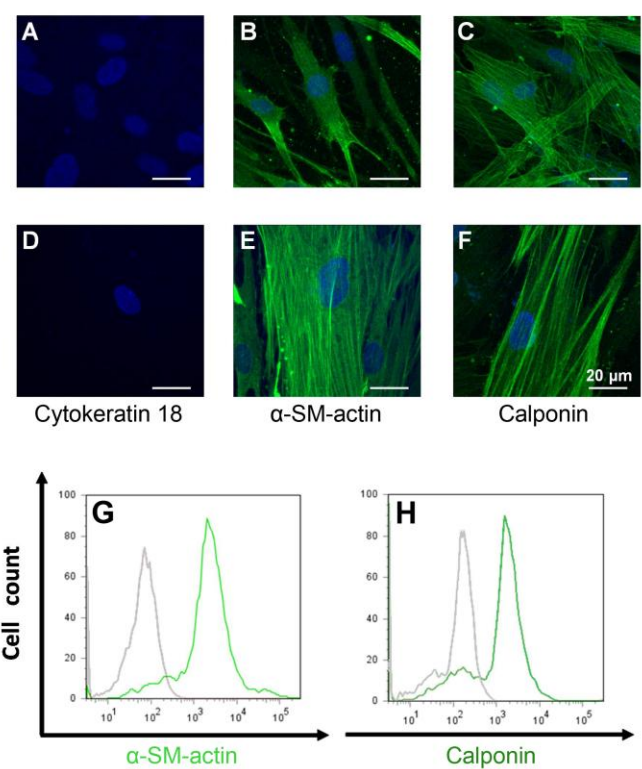


Figure S2

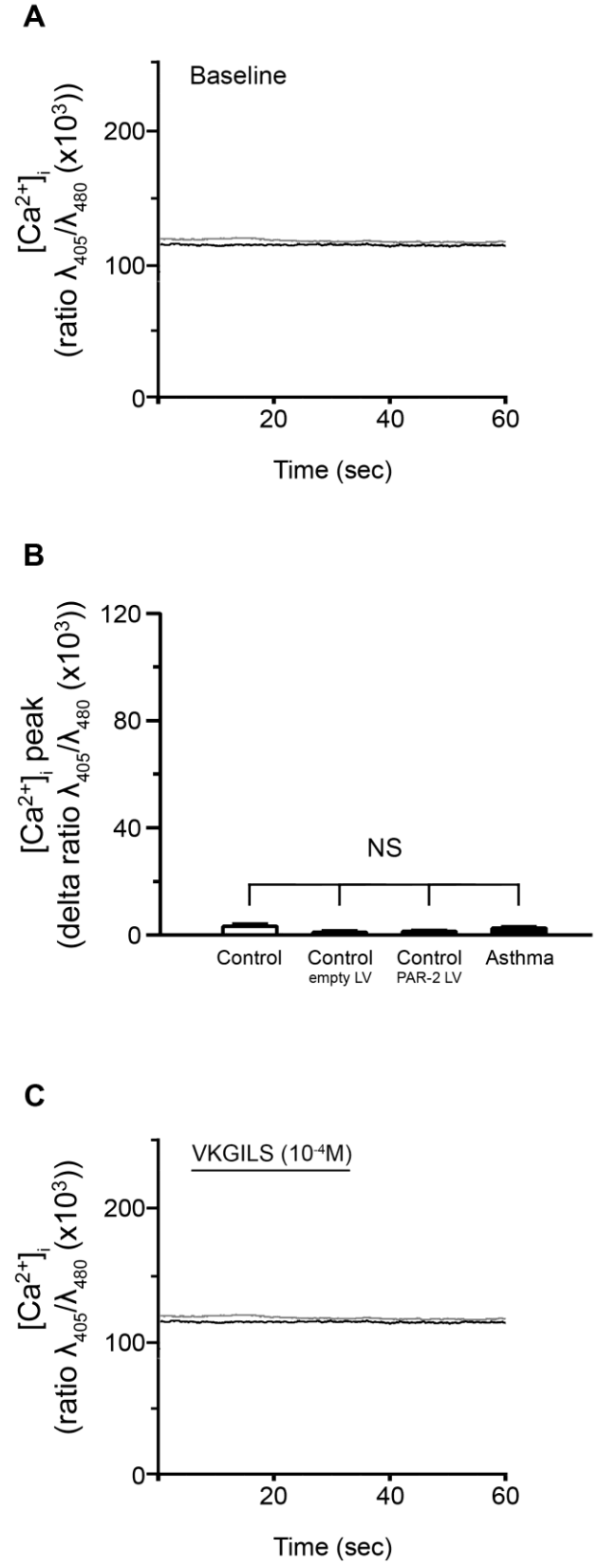


Figure S3

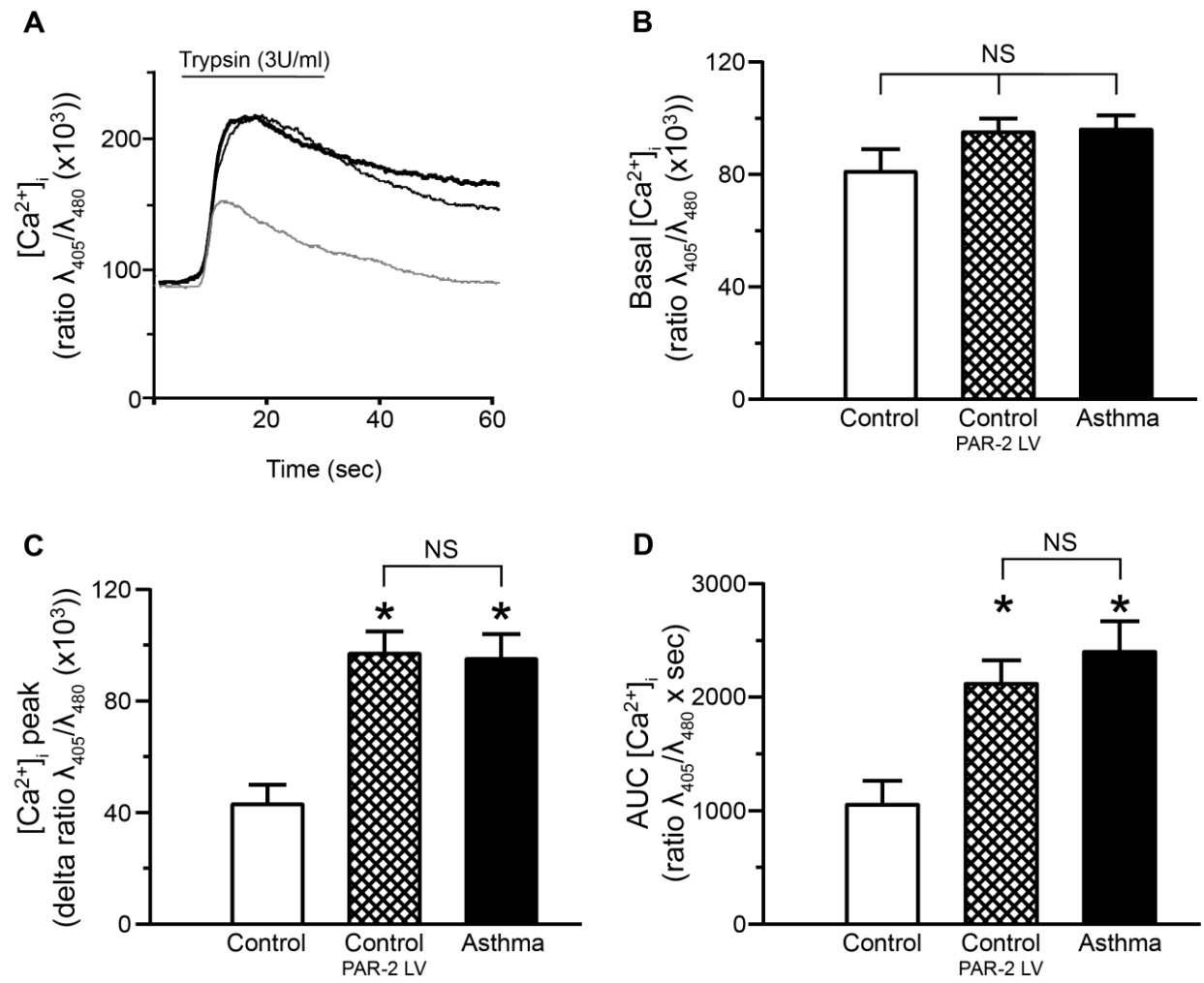


Figure S4

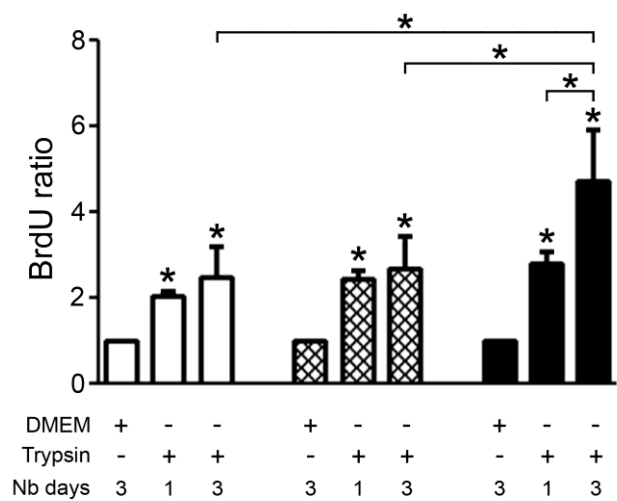


Figure S5

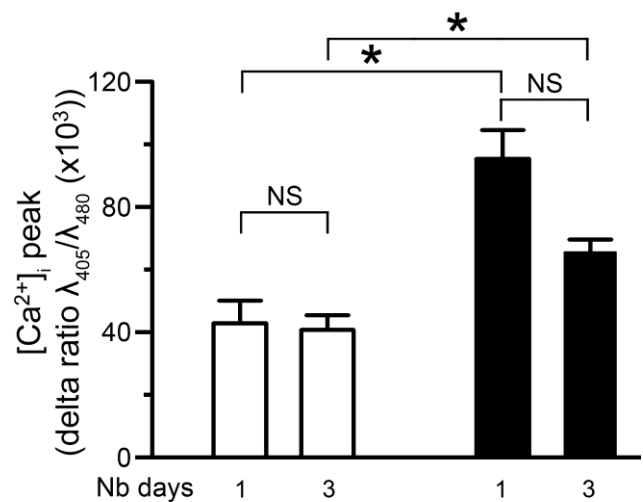


Figure S6

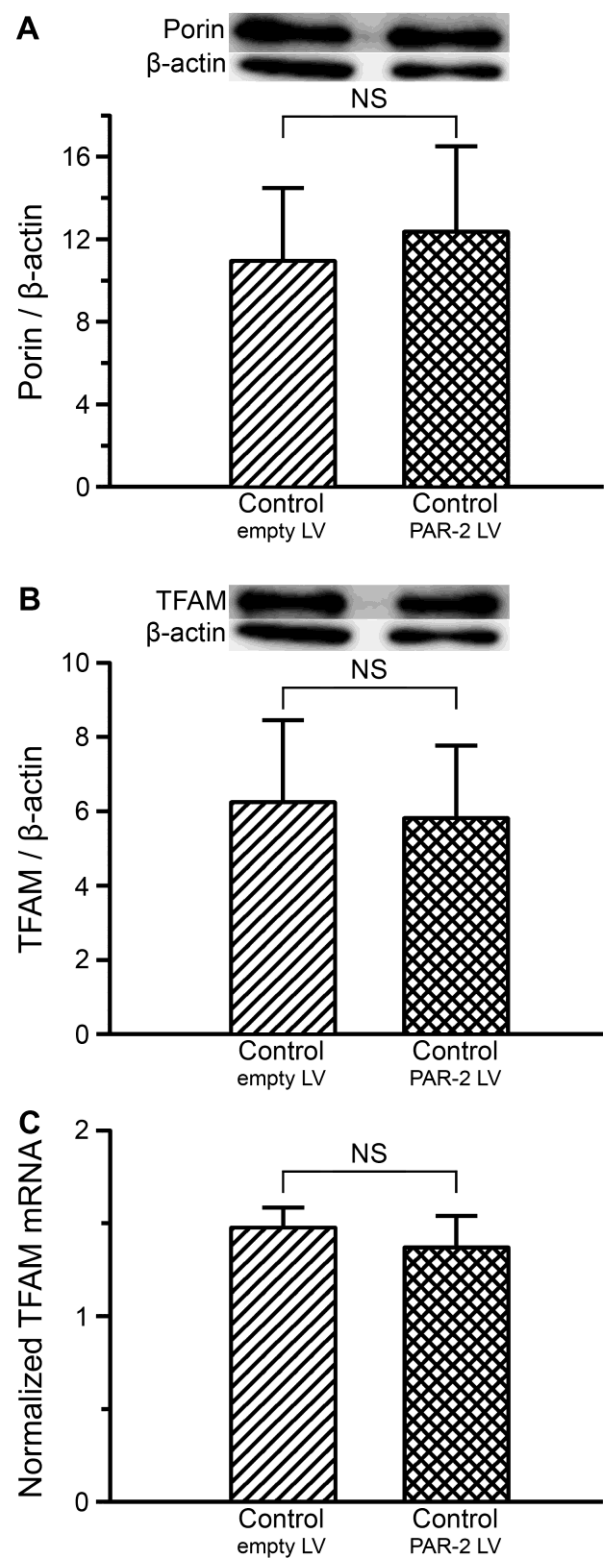


Figure S7

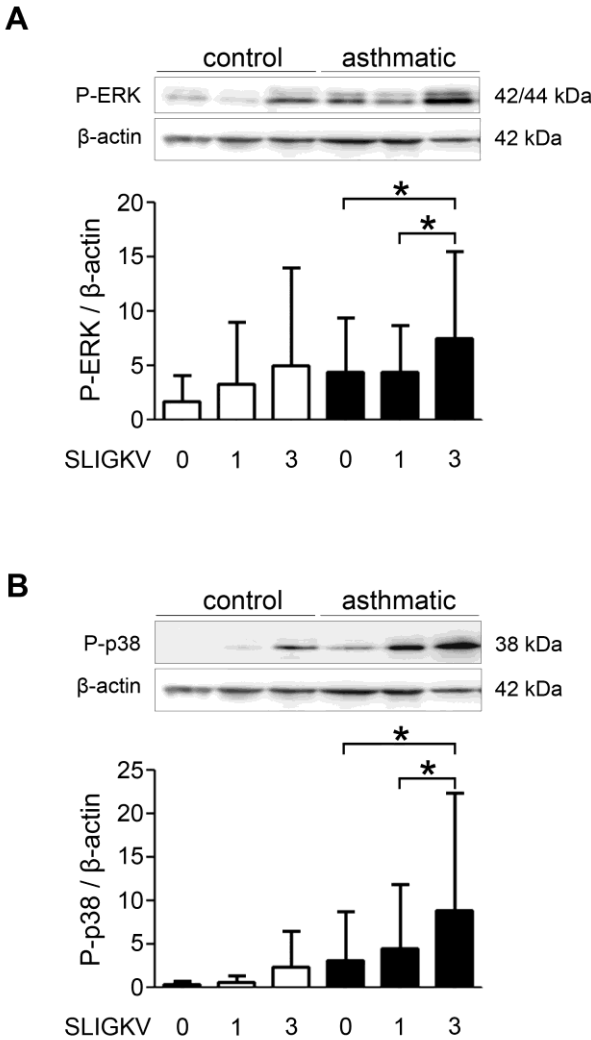
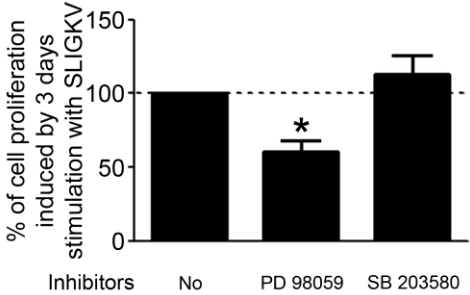


Figure S8



Supporting Materials and Methods

Ethics statement

All patients gave their written informed consent to participate to the study, after the nature of the procedure had been fully explained. The study followed recommendations outlined in the Helsinki Declaration and received the approval from the local ethics committee (“CPP Sud-Ouest et Outre mer IV”).

Study populations

A total of 22 patients with mild to severe persistent asthma, and 33 non asthmatic subjects were prospectively recruited from the “Centre Hospitalier Universitaire (CHU)” of Bordeaux according to Global Initiative for Asthma criteria [1]. Bronchial specimens were obtained by either fiberoptic bronchoscopy or lobectomy, as described previously [2,3] (See Table 1 for patients’ characteristics). For non asthmatic subjects, we used bronchi from a grossly normal part of the lung specimen. The majority of non asthmatic subjects (32/33) presented distal lung carcinoma.

Cell culture

Human bronchial smooth muscle (BSM) cells were derived from bronchial specimens as previously described [2], from non asthmatic and asthmatic patients (See Table 1 for patients’ characteristics). Cells were cultured and maintained in DMEM (PAN Biotech, Brumath, France)

containing 10% (v/v) FCS (PAN Biotech) and 4.5 g/L glucose, supplemented with 2 mM l-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin, and 0.25 mg/ml amphotericin B2 (antimycotic/antibiotic solution), 1 mM sodium pyruvate, and 1% (vol/vol) nonessential amino acid mixture (all from PAN Biotech), as previously described [4,5]. The medium was changed every 48–72 h.

We assessed cell purity by both immunocytochemistry and flow cytometry, on growth arrested cells using serum-free DMEM for 48 h (Figure S1). For immunocytochemistry, cells were rinsed in PBS and fixed with paraformaldehyde 4% for 10 min (PFA, Santa Cruz Biotechnology, Nanterre, France). Cells were rinsed in PBS and permeabilized with Triton X-100 0.5% (PAN Biotech). Cells were rinsed in PBS and nonspecific staining was blocked using PBS containing 4% Bovine Serum Albumin (BSA, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) for 30 min. Monoclonal antibodies (Abs) diluted in PBS with 1% BSA, including anti- α -smooth muscle actin (α -SMA, Sigma-Aldrich), anti-calponin (Santa Cruz) and anti-cytokeratin 18 (Sigma-Aldrich) were incubated for 1 h. Control samples were treated similarly, using an unrelated Ab (mouse IgG; Sigma-Aldrich). After rinsing with PBS, the cells were incubated for 1 h with appropriate secondary Abs (Alexa Fluor 488 or 568) (Life Technologies, Saint Aubain, France). The nuclei are labeled with DAPI (Life Technologies). Slides were mounted with a drop of fluorescent mounting medium (Dako, Trappes, France) and observed under a fluorescence microscope (Nikon, Paris, France). For flow cytometry, BSM cells were harvested, fixed and permeabilized in 4% paraformaldehyde containing 0.1% saponin (Sigma-Aldrich). BSM cells were then labeled with primary antibodies indirectly labeled with appropriate fluorescent-conjugated secondary antibodies. Primary antibodies were either mouse monoclonal α -smooth muscle actin Ab or rabbit monoclonal anti-calponin Ab. Appropriate isotype control antibodies

were systematically used. Analysis was performed using a double colour flow cytometry on a FACSCanto® (BD Biosciences, Pont de Claix, France). Cell purity was stable between passages 2 and 5, and was always more than 80% using flow cytometry and more than 90% using immunocytochemistry (Figure S1) in both asthmatic and non asthmatic BSM cells.

All experiments were performed on phenotypically confirmed BSM cells between passages 2 and 5 [2]. In each experiment, we compared BSM cells of the same passages from both non asthmatic and asthmatic subjects. Depending on the experiments, BSM cells were seeded on 96-well plates for BrdU incorporation, on 6-well plates for immunoblotting and flow cytometry, on 12-well plates for lentiviral transduction and quantitative RT-PCR.

BSM cell stimulation

A synthetic peptide with a sequence corresponding to the tethered ligand domain of PAR-2 (SLIGKV in humans) has been employed experimentally to activate PAR-2 without proteolytic cleavage [6]. We also used the reverse peptide VKGILS-NH₂ as negative control for SLIGKV-NH₂ experiments [4]. Both SLIGKV-NH₂ and VKGILS-NH₂ (PolyPeptide Group, Strasbourg, France) were used on growth arrested BSM cells at 10⁻⁴ M and, were changed every 24 h for 1 to 3 days for proliferation, PAR-2 expression, transduction cell and calcium study. Similarly, trypsin was used to activate PAR-2 at 30 mU/ml and was changed every 24 h for 1 to 3 days for proliferation assay and at 3 U/ml for calcium study. In order to determine the EC50 to SLIGKV-NH₂, cell proliferation was assessed using SLIGKV-NH₂ at various concentrations from 10⁻⁹ M to 10⁻⁴ M.

PAR-2 expression

PAR-2 expression was evaluated by flow cytometry, western blot and quantitative RT-PCR.

For flow cytometry, BSM cells were fixed with paraformaldehyde 4% (Santa Cruz Biotechnology) for 15 min in ice and washed twice with 0.5% BSA (Sigma-Aldrich). Mouse IgG anti-human PAR-2 (SAM11; Santa Cruz Biotechnology) or isotype control (Sigma-Aldrich) at the same concentration of 20 µg/ml was added to BSM for 30 min in ice. After an additional wash, secondary FITC-conjugated goat anti-mouse IgG (Immunotech, Marseille, France) was then added for another 30 min in ice. Cells were analyzed for their fluorescence intensity using FACSCanto[®] (BD Biosciences). Normalized median fluorescence intensities were calculated by dividing PAR-2 median fluorescence intensity by isotype control median fluorescence intensity. Results were presented as mean normalized median fluorescence intensity \pm SEM.

For western blot, BSM cells were rinsed in cold PBS, and immunoblotting was performed on cell protein extracts [7]. Cells were lysed with 50 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% Igepal, 2 mM EDTA, supplemented with complete protease inhibitors (Roche, Meylan, France). Lysates were cleared by a centrifugation at 12,000 g at 4°C, and protein concentration determined using Lowry (Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, France). Samples were resolved on 5–20% SDS-PAGE gels and transferred to nitrocellulose membranes (Amersham Biosciences, Fontenay-sous-Bois, France). The immunoblots were then developed using 1 µg/ml of mouse monoclonal anti-human PAR-2 antibody (SAM11), 0.8 µg/ml of mouse anti-human β -actin, or irrelevant antibody (all from Santa Cruz Biotechnology). A biotinylated swine secondary antibody (Dako) and a streptavidin–biotinylated horseradish peroxidase complex (Dako) were used for amplification [5]. Immunoblots were revealed by enhanced chemiluminescence

Immobilon (Millipore, Molsheim, France). Blot images were acquired using BioCaptMW (Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France), and band densities were quantified using ImageJ[®] software (National Institutes of Health).

For quantitative RT-PCR, BSM cell total RNA was extracted and reverse transcribed into cDNA using AMV reverse transcriptase (Sigma-Aldrich) as previously described [2]. Briefly, real time PCR was performed on a Rotorgene 2000 (Corbett Research, Mortlake, Australia), using specific PAR-2 primers previously optimized [3] (NM_005242) forward 5'-CCGAACTAAGAAGAAGCACC-3' reverse 5'-AGAAAAAGCCAATAAGCACAT-3'; or other primers specific for tyrosin 3-monooxygenase/tryptophan 5'-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide (YWHAZ) (NM_003406), forward 5'-GGGGATGTGGAATTTTATACAAG-3' and reverse 5'-CGCCAGGACAAACCAGTATGTAG-3'; for hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (HPRT-1) (NM_000194), forward 5'-GTGAAAAGGACCCCACGAA-3' and reverse 5'-AGTCAAGGGCATATCCTACAACAA-3'; and for human acidic ribosomal phosphoproteins (PO) (NM_001002), forward 5'-CAACGGGTACAAACGAGTC-3' and reverse 5'-CTTCCTTGGCTTCAACCTTAG-3'.

The efficiency of the PCR reactions was always >90%. The specificity of the amplified PCR products was examined with the melting curve analysis, and also in 2% agarose gel containing SYBER[®] Green (Invitrogen, Life Technologies, Saint Aubin, France). The RT-PCR expression of PAR-2 was then presented as an arbitrary unit and normalized to endogenous references (geometric averaging of three internal control genes; *i.e.* YWHAZ, HPRT-1, and PO) according to geNorm software [8].

Lentivirus over-expressing PAR-2

The genomic library clone IRATp970H0715D (<http://www.imgenes-bio.com>), containing PAR-2 ORF cDNA was used to amplify the coding sequence of the gene using the following primers (forward 5'- ATGCGGAGCCCCAGCGCG-3' and reverse 5'-TCAATAGGAGGTCTTAAC-3'). The obtained PCR fragment was then cloned into a transfer lentiviral plasmid containing a GFP reporter gene (Plate-forme de vectorologie SFR TransBioMed, Univ Bordeaux, France). Three plasmids were then co-transfected in human embryonic kidney cells (293T): (i) transfer plasmid vector containing PAR-2 sequence, (ii) packaging plasmid pVSV-G (Trono, Geneva, Switzerland) and (iii) the HIV structure plasmid (Trono) to produce replication-deficient lentiviral particles. Control lentiviral particles were also produced similarly using non modified transfer plasmid. Infectious titers were determined by transducing the 293T cell with serial dilution of viral supernatant. GFP expression was quantified 5 days later by flow cytometry [9].

BSM cells (400 000 cells/ml) were then transduced with optimized concentration of either control or PAR-2 lentiviral particles in 12-well plates. The efficacy of transduction was assessed using both flow cytometry and real time quantitative RT-PCR seven days post transduction.

Microspectrofluorimetric measurement of cytosolic calcium

The Ca^{2+} -sensitive fluorescent probe indo-1 was used to record changes in intracellular calcium concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) in cells, as described previously [5]. BSM cells were incubated during 30 minutes in a Kreb's modified solution containing 5 μM of indo-1 penta-acetoxymethyl ester (indo1/AM; I-1223, Molecular Probes, Life Technologies) at room temperature. Cells were then washed 15 minutes in indo-1/AM free solution and maintained at room temperature in the same solution. The indo-1 calcium probe was excited at 355 nm and the emitted fluorescence was recorded at 405 nm and 480 nm. The fluorescence ratio ($\lambda_{405}/\lambda_{480}$) representing the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was

calculated and recorded using the pCLAMP software. After 5 seconds, each cell was stimulated during 30 seconds with SLIGKV-NH₂ or VKGILS-NH₂ peptide at 10⁻⁴ M. It should be noted that, for calcium analysis following repeated PAR-2 stimulation by SLIGKV-NH₂, a wash out of SLIGKV-NH₂ was performed during Indo-1 loading and washing. For analysis, the calcium peak induced by the peptide stimulation and the area under curve were determined using the Clampfit 10.2 software (Axon Instrument, California, United States).

Cell proliferation

Cell proliferation was evaluated using BrdU incorporation, as described previously [3]. BSM cells were growth-arrested using serum deprived culture medium for 24 h and stimulated with either the SLIGKV-NH₂ or VKGILS-NH₂ peptide, at the concentration of 10⁻⁴ M, for 1 to 3 days. DNA synthesis was assessed using the BrdU kit according to the manufacturer's instructions (Roche Diagnostics, Meylan, France). Briefly, BSM cells were incubated with 10 µM BrdU for 24 h at 37°C. Cells were fixed and denaturized for 30 min at room temperature and incubated with the anti-BrdU Ab for 2 h at room temperature. Absorbance was measured at 370 nm in a microplate reader (SPECTROstarNano, BMG Labtech, Champigny sur Marne, France). All experiments were performed in triplicate. Results were expressed as a normalized ratio of BrdU incorporation, *i.e.* absorbance for test condition divided by absorbance for control serum-deprived condition.

Cell transduction

AKT, ERK and p38 phosphorylation were analyzed following 1 to 3 days challenge with SLIGKV-NH₂, using western blot as previously described [3]. Briefly, the immunoblots were

developed using phospho-specific antibodies against AKT, ERK or p38 (Cell Signaling Technology, Saint Quentin Yvelines, France) and, after stripping, anti-total AKT, ERK or p38 (Cell Signaling Technology) and anti-human β -actin (Sigma-Aldrich) for 14 h at 4°C. As for PAR-2, we used the same methods described for amplification, revelation, images acquisition and analysis.

Cell proliferation following 3 days of stimulation with SLIGKV-NH₂ was also evaluated in the absence or in the presence of ERK inhibitor PD98059 (Calbiochem, up to 50 μ M) or p38 inhibitor SB203580 (Calbiochem, up to 10 μ M), as previously described [3].

Mitochondrial mass was assessed by the porin content using western blot, and mitochondrial biogenesis was assessed by peroxysome proliferator-activated receptor γ co-activator-1 α (PGC-1 α), nuclear respiratory factor-1 (NRF-1) and mitochondrial transcription factor A (TFAM) contents using both quantitative RT-PCR and western blot, as previously described [2]. Briefly for western blot, the immunoblots were developed using mouse anti-human porin (MitoSciences, Mundolsheim, France), mouse anti-human β -actin (Sigma-Aldrich), mouse anti-human PGC-1 α , anti-human NRF-1, or anti-TFAM (all purchased from Abcam, Paris, France). For quantitative RT-PCR, primers were as follows: for TFAM (NM_003201), forward 5'-GAAGTCGACTGCGCTCCC-3' and reverse 5'-ACTCCGCCCTATAAGCATC-3'; for PGC-1 α (NM_013261), forward 5'-GTCACCACCCAAATCCTTATT-3' and reverse 5'-GGCGATCTTGAACGTGAT-3'; for NRF-1 (NM_005011), forward 5'-AAGATCAGCAAACGCAAACAC-3' and reverse 5'-CCCGTACCAACCTGGATAAGT-3'.

Statistical analysis

The statistical analysis was performed with NCSS software (NCSS 1997[®]; NCSS Statistical software, Kaysville, Utah). Values are presented as the mean \pm SD or SEM. Statistical significance was analyzed by paired Wilcoxon tests and Mann and Whitney tests. A p value < 0.05 was considered statistically significant.

References

1. GINA Global Strategy for Asthma Management and Prevention, Global Initiative for Asthma (GINA). (2012). Available from: <http://www.ginasthma.org>.
2. Trian T, Benard G, Begueret H, Rossignol R, Girodet PO, et al. (2007) Bronchial smooth muscle remodeling involves calcium-dependent enhanced mitochondrial biogenesis in asthma. *J Exp Med* 204: 3173-3181.
3. Bara I, Ozier A, Girodet PO, Carvalho G, Cattiaux J, et al. (2012) Role of YKL-40 in bronchial smooth muscle remodeling in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 185: 715-722.
4. Berger P, Perng DW, Thabrew H, Compton SJ, Cairns JA, et al. (2001) Tryptase and agonists of PAR-2 induce the proliferation of human airway smooth muscle cells. *J Appl Physiol* 91: 1372-1379.
5. Trian T, Girodet PO, Ousova O, Marthan R, Tunon-de-Lara JM, et al. (2006) RNA interference decreases PAR-2 expression and function in human airway smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 34: 49-55.
6. Bohm SK, Kong W, Bromme D, Smeekens SP, Anderson DC, et al. (1996) Molecular cloning, expression and potential functions of the human proteinase-activated receptor-2. *Biochem J* 314 (Pt 3): 1009-1016.

7. Carvalho G, Poalas K, Demian C, Hatchi E, Vazquez A, et al. (2011) Participation of the cell polarity protein PALS1 to T-cell receptor-mediated NF-kappaB activation. PLoS One 6.
8. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, et al. (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biol 10;3: research0034.0031–0034.0011.
9. Robert-Richard E, Richard E, Malik P, Ged C, de Verneuil H, et al. (2007) Murine retroviral but not human cellular promoters induce in vivo erythroid-specific deregulation that can be partially prevented by insulators. Mol Ther 15: 173-182.

Ainsi, il existe une augmentation de l'expression du PAR-2 *in vitro* dans les CML d'asthmatiques. De plus, la stimulation répétée du PAR-2 augmente la prolifération des seules CML d'asthmatiques, par un mécanisme dépendant de la voie ERK. Des données très récentes montrent que la voie p38 n'est finalement pas impliquée.

Nous avons aussi mis en évidence que la réponse calcique est dépendante du niveau d'expression du récepteur, mais n'influence pas la réponse proliférante. Nos résultats sur le niveau d'expression du PAR-2 sont en contradiction avec les résultats *ex vivo* de Knight et al qui montrent une expression semblable entre le muscle lisse bronchique de témoins et d'asthmatiques et une augmentation du PAR-2 uniquement dans l'épithélium des asthmatiques. Nos résultats *in vitro* devront être confirmés auprès d'une large population d'asthmatiques dont le phénotype/endotype aura été documenté. En effet, il existe une forte hétérogénéité inter-patients et le phénotype doit permettre de la diminuer.

En plus de la tryptase mastocytaire, d'autres activateurs du PAR-2 pourraient être des candidats pour la stimulation chronique du récepteur. YKL-40, une chitinase-like produite notamment par l'épithélium, serait un candidat intéressant. En effet, nous avons déjà mis en évidence son implication dans l'activation du PAR-2 des CML bronchiques [131]. Il serait ainsi pertinent d'étudier les effets d'une stimulation chronique des CML, par ce produit de sécrétion épithéliale.

Dans cet esprit de relation épithélium/muscle lisse, nous avons cherché à savoir si le produit de la stimulation épithéliale par les acariens de poussières de maison aurait un impact sur le muscle lisse bronchique.

I – B – Étude de la stimulation de l'épithélium par les acariens de poussières de maison sur la prolifération des cellules musculaires lisses bronchiques d'asthmatiques

L'épithélium est la première barrière de défense contre les agents pathogènes. Dans le contexte de l'asthme, les stimulations de l'épithélium bronchique par les moisissures, les rhinovirus et les acariens de poussières de maison (HDM, House Dust Mites) sont responsables de la très grande majorité des exacerbations [260].

Parmi celles-ci, les acariens sont connus pour activer le PAR-2. Miglino et al ont montré que la stimulation des CML d'asthmatiques par un extrait d'acariens entraîne une augmentation de la prolifération et de la production d'IL-6 [233]. Cependant, étudier les effets d'une stimulation directe des CML par les acariens semble peu représentatif de la réalité. Des études sur des lignées épithéliales montrent que les protéases Der p 1, 3 et 9 (cystéine protéase (1) et sérines protéases (3 et 9) de *Dermatophagoides pteronyssinus*, une espèce d'acarien domestique) induisent une augmentation du calcium intra-cellulaire et la production d'IL-6, d'IL-8, de GM-CSF et d'éotaxine [204, 210]. Pour se rapprocher des conditions physiologiques, nous avons mis en place au laboratoire la culture des cellules épithéliales bronchiques primaires en interface air/liquide (ALI). Une fois l'épithélium reconstitué, il est stimulé par HDM, puis les effets des médiateurs produits au pôle basal de l'épithélium peuvent être testés sur les CML.

Article n°3:

House dust mites induce asthmatic smooth muscle cell proliferation through epithelium- and leukotrienes-dependent pathways

Thomas Trian ^{*}, Benoit Allard ^{*}, Gabrielle Carvalho, Isabelle Dupin, Olga Ousova,
Elise Maurat, Matthieu Thumerel, Pierre-Olivier Girodet, Roger Marthan, and Patrick
Berger (* participation équivalente)

(Manuscrit en préparation)

**House dust mites induce asthmatic smooth muscle cell proliferation through
epithelium- and leukotrienes-dependent pathways**

Thomas Trian^{*,1,2}, Benoit Allard^{*,1,2}, Gabrielle Carvalho^{1,2}, Isabelle Dupin^{1,2}, Olga Ousova^{1,2}, Elise Maurat^{1,2}, Jehan Bataille^{1,2}, Matthieu Thumerel^{1,2,3}, Pierre-Olivier Girodet^{1,2,3}, Roger Marthan^{1,2,3}, and Patrick Berger^{1,2,3}

* Authors contributed equally to this work

¹Univ. Bordeaux, Centre de Recherche Cardio-thoracique de Bordeaux, U1045, Département de Pharmacologie, CIC 0005, F-33000 Bordeaux, France

²INSERM, Centre de Recherche Cardio-thoracique de Bordeaux, U1045, CIC 0005, F-33000 Bordeaux, France

³CHU de Bordeaux, Service d'Exploration Fonctionnelle Respiratoire, CIC 0005, F-33604 Pessac, France

Corresponding author: Pr. Patrick Berger, Centre de Recherche Cardio-thoracique de Bordeaux, INSERM, U1045, Université Bordeaux Segalen, 146 rue Léo Saignat. 33076 Bordeaux Cedex, France.

Telephone: 33 5 57 57 16 94 Fax: 33 5 57 57 16 95

E-mail: patrick.berger@u-bordeaux2.fr

Introduction

Asthma is a very frequent airway disease that affects 5 to 20% of the whole population worldwide¹. Whereas the mortality of asthma has been dramatically decreased within the last 10 years, uncontrolled asthma still induces major consequences on morbidity, quality of life, and economic burden². Asthma control determinants have been associated to sensitization to indoor allergens^{3 4 5} which are involved in 85% of asthma worldwide and even more in children⁶. Such a sensitization occurs after chronic airway exposure to indoor allergens like mould and more frequently house dust mites (HDM)⁶. Epidemiological data indicate that outcome of asthma in adults may be determined in early childhood⁷, suggesting that early airway damages following chronic exposure to HDM may be irreversible.

One of the possible hypotheses explaining the development of these irreversible damages may be the presence of bronchial remodeling. On the one hand, such a remodeling appears very early in the natural history of asthma⁸⁻¹⁰, and, on the other hand, current treatments are poorly effective in reducing most of the various components of bronchial remodeling particularly in severe asthma¹¹. Indeed, bronchial remodeling is described as an abnormal increased thickening of the bronchial wall due to various structural alterations including abnormal epithelium, sub-epithelial membrane thickening, alteration in extracellular matrix deposition, neoangiogenesis, mucus gland hypertrophy and an increased bronchial smooth muscle (BSM) mass¹². This latter appears to be one of the most important features of bronchial remodeling since increased BSM mass is associated with a decrease in lung function^{13,14}. It is now well admitted that, BSM remodeling is related with an increase of asthmatic BSM cell proliferation both in vitro and in vivo¹⁴⁻¹⁷.

The relationship between HDM and BSM remodeling is of particular interest but remains unclear. HDM have been shown to directly induce the proliferation of BSM cells in vitro ¹⁸. However, it is unlikely that HDM could directly interact with BSM in vivo, even if HDM has been shown to disrupt the integrity of the tight junctions between epithelial cells ¹⁹. Indeed, airway exposure with HDM is supposed to firstly interact with bronchial epithelium, at the interface of host-environment interactions. Moreover, we have recently demonstrated that, YKL-40, highly produced by the bronchial epithelium of severe asthmatics, induced the proliferation of BSM cells ²⁰, suggesting that epithelium-BSM interactions may be an important pathway involved in BSM remodeling.

Thus, the aim of this study was to evaluate the effect of HDM on asthmatic and non asthmatic BSM cell proliferation through a bronchial epithelium / BSM interaction in vitro. For this purpose, we have developed an in vitro model of epithelium in air liquid interface (ALI) and BSM interaction. We found that epithelial stimulation by HDM increases the proliferation of asthmatic BSM cells and not that of non asthmatics. The mechanisms involve a protease activating receptor (PAR)-2-dependent epithelial production of leukotrienes C4 and an over-expression of leukotrienes receptor CysLTR1 by asthmatic BSM cells.

Results

Using BrdU incorporation, we assessed the proliferative effect of baso-lateral supernatants obtained from asthmatic and control ALI bronchial epithelial cells on asthmatic and control BSM cells (Figure 1A). We found that, epithelial supernatants from un-stimulated control bronchial epithelial cells increased the proliferation of BSM

cells from both asthmatics and controls to a similar level of that induced by 10% fetal calf serum (FCS) (Figure 1A). As for FCS, the proliferation induced by such supernatants was increased in asthmatic BSM cells as compared to that of controls ($p \leq 0.001$). Interestingly, stimulation of the bronchial epithelium with HDM induced a significant supplemental increase of the proliferation of asthmatic BSM cells ($p \leq 0.003$), but had no effect on that of control BSM cells (Figure 1A). Such an increased proliferation was related to the effect of HDM on the epithelium since, the same culture medium containing HDM without any epithelium did not induce any proliferation (Figure 1A). In another set of experiments, we compared the effects of supernatants produced by both control and asthmatic bronchial epithelium (Figure 1B). Results were similar in both epithelial conditions confirming that, the origin of the epithelium does not play a role in the proliferation of BSM cells. All the subsequent experiments were then done using control epithelial cells. Moreover, we explored the effects of passive sensitization of control bronchial epithelium (Figure 1C). Using serums from HDM allergic asthmatic or non allergic asthmatic patients did not modify the effect of HDM through the bronchial epithelium on the proliferation of asthmatic BSM cells (Figure 1C). These latter results suggested that HDM stimulate bronchial epithelium independently of the IgE receptor. Since HDM is known to have a serine protease activity, we assessed the role of PAR-2. Optimal concentration of anti-PAR-2 blocking antibody, determined previously²⁰, was able to suppress the supplemental increase of the proliferation of asthmatic BSM cells induced by HDM stimulation of the epithelium (Figure 1D).

We then looked at the effects of dexamethasone, a potent anti inflammatory molecule used in asthma therapy. Interestingly, pre treatment of the epithelium with

dexamethasone, suppressed the effect of HDM stimulation on the asthmatic BSM cell proliferation in a concentration-dependent manner (Figure 2A). It should be noted that dexamethasone did not alter the proliferation of BSM cells when added on the BSM cells (data not shown). All these results suggest that HDM stimulation of the epithelium was able to induce the production of inflammatory molecules which in turn activate specifically the proliferation of asthmatic BSM cells. Using a multi array membrane, we assessed the production level of various cytokines and growth factors produced by the epithelium with or without HDM stimulation. In the absence of HDM, bronchial epithelial cells produced a large range of smooth muscle cell proliferative factors (Supplemental Figure 1A). However, the presence of HDM did not modify the production level of those factors by bronchial epithelial cells (Supplemental Figure 1B). Using ELISA, we also looked at the effects of HDM on the epithelial production of IL-33 and TSLP²¹⁻²³, which are known to be produced by bronchial epithelial cells under inflammatory conditions. Similarly, HDM was unable to increase the production of these factors (data not shown). Since HDM did not modify the production of all these cytokines and growth factors, we then focused our attention on lipid inflammatory mediators and more particularly on leukotrienes. Indeed, it has been shown that bronchial epithelium was able to produce leukotrienes especially in response to aggression^{24,25}. We then first assessed the level of leukotriene in ALL bronchial epithelial supernatant. Using ELISA, we found a significant leukotriene LTC₄ production in HDM-stimulated epithelial supernatants whereas no detectable leukotrienes were found in un-stimulated epithelial supernatants (Figure 2B). To further explore the transduction mechanisms of this leukotriene production, we assessed the mRNA levels of various genes. Indeed, leukotriene C₄ is produced from arachidonic acid through a pathway mainly involving 5-Lipoxygenase (5-LO), 5-

LO-activating protein (FLAP) and LTS4S Synthase. We found a significant increase in the mRNA level of 5LO, FLAP and LTS4S in HDM stimulated ALI bronchial epithelium, whereas the mRNA level of LTH4S, implicated in leukotriene B production, is not significantly different (Figure 3). To further explore the role of leukotriene C4, we used montelukast on BSM cells, to block its receptor CystLTR1. Montelukast was able to suppress the supplemental increase of the proliferation of asthmatic BSM cells induced by HDM stimulation of the epithelium, but was inefficient to reduce that of control BSM cells and that in asthmatic BSM cells without any stimulation (Figure 4A). Finally, we assessed the expression of CystLTR1 in asthmatic and control BSM cells by flow cytometry. We found a significant increase of CystLTR1 expression in asthmatic BSM cells as compared to non asthmatic BSM cells (Figure 4B).

Discussion

Taken together, this study demonstrates that ALI bronchial epithelium is able to induce BSM cell proliferation from both asthmatic and control subjects. Moreover, HDM induce the epithelial production of leukotrienes, which in turn, increases the proliferation of asthmatic BSM cells only.

The proliferative effect of un-stimulated epithelial baso-lateral supernatant was significantly increased using BSM cells from asthmatic patients as compared to non asthmatic cells. This finding is of great interest since, such an increased asthmatic BSM cell proliferation has only been demonstrated previously using fetal calf serum¹⁵⁻¹⁷, but was not reproduced using other proliferative stimuli, such as PDGF or YKL-40²⁰. As for BSM proliferation induced by fetal calf serum¹⁶, that induced by

epithelial supernatant is insensitive to corticosteroids at the smooth muscle level. Moreover, we found that pretreatment of the epithelium with dexamethasone is also unable to reduce the proliferative effect induced the spontaneous release of the epithelium on BSM cells. These results strongly suggest that bronchial epithelium spontaneously induces the proliferation of BSM cells through a steroid-resistant pathway. Bronchial epithelium appeared to be phenotypically different in asthma both in vivo and in vitro ²⁶. For instance, asthmatic epithelial cells produced more TGF- β , IL-11 ²⁷, CXCL8 (IL-8), mucins and less lipoxin A4 ^{26,28}. In this study however, the nature of the bronchial epithelium, from either non asthmatic or asthmatic patients, does not seem to alter the proliferation of BSM cells, suggesting that these cells are intrinsically different in asthma. Indeed, we previously demonstrated that asthmatic BSM cells were characterized by an increased mitochondrial biogenesis related to an abnormal calcium homeostasis ¹⁷.

The second important finding of this study is the supplemental increase of the asthmatic BSM cell proliferation induced by HDM-stimulated epithelium through a leukotriene dependent pathway. This is the first demonstration that HDM induce epithelial leukotrienes production. Such results are in agreement with previous study demonstrating that epithelial cells are able to produce leukotrienes in response to various stimuli such as LPS ²⁴ or an association of acetylcholine and cigarette smoke extracts ²⁵. In this study, we showed that HDM are able to increase both the release of leukotrienes C4 and the production of enzymes' transcripts implicated in the epithelial leukotrienes production. Moreover, we demonstrated that HDM activate epithelial cells through PAR-2. This finding confirm previous findings ^{29,30}, and suggest that blocking PAR-2 could be an interesting target in asthma. Indeed, it has been shown that direct activation of BSM PAR-2 induced BSM cell proliferation ^{20,31},

and here we demonstrate that activation of epithelial PAR-2 also induces BSM cell proliferation. However, epithelial PAR-2 activation also induced a BSM relaxation through a prostaglandin dependent mechanism ³². In this paper, we also demonstrate that this HDM-dependent leukotrienes epithelial production is able to increase asthmatic BSM cell proliferation although that of non asthmatic is not modified. The reason of this specificity to asthmatic BSM cells appeared to be related with an increased expression of LTC₄ receptor (*i.e.* CystLTR1). These results are in agreement with the transgenic over expression of human CystLTR1 in mice which increased leukotrienes BSM responsiveness ³³. Moreover, in such transgenic mice, there was enhanced calcium signaling upon leukotrienes stimulation and we previously demonstrated that an abnormal calcium homeostasis was a key starting event leading to increased mitochondrial biogenesis and proliferation in asthmatic BSM ¹⁷. The role of leukotrienes in BSM remodeling is also supported by the study of Henderson et al ³⁴ in which, montelukast decreased BSM mass in a chronic mouse model of asthma ³⁴. In this study, montelukast suppresses the supplemental increase of the proliferation of asthmatic BSM cells induced by HDM stimulation of the epithelium. However, montelukast is unable to block the BSM cell proliferation induced by un-stimulated epithelium.

In conclusion, this work demonstrate the role of HDM on BSM remodeling that occurs only in asthmatic patients and highlight different therapeutic targets at both epithelium and smooth muscle level.

Methods

Study populations

A total of X patients with severe persistent asthma, and X normal controls were recruited from the Center Hospitalier Universitaire of Bordeaux, France, according to the Global Initiative for Asthma ¹. All subjects gave their written informed consent to participate to the study, after the nature of the procedure had been fully explained. The study received approval from the local ethics committee. Bronchial specimens from all subjects were obtained by either fiberoptic bronchoscopy or lobectomy, as previously described ¹⁷.

Cell Culture

Human bronchial smooth muscle (BSM) cells were derived from bronchial specimens as described previously ³⁵. Cells were cultured and maintained in DMEM (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) containing 10% FCS (Invitrogen) and 4.5 g/L glucose, supplemented with 2mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin, and 0.25 mg/ml amphotericin B (Invitrogen), 1 mM sodium pyruvate, and 1% non essential amino acid mixture (Sigma-Aldrich, Saint Quentin-Fallavier, France). All experiments were performed on phenotypically confirmed BSM cells between passages 2 and 5 ¹⁷. BSM cells were serum deprived for 24 hours and stimulated with 10% FCS or with epithelium supernatant with or without exposition with the major allergen of house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus* Der p1 extract (10µg/ml, 24hours) (kindly provided by Stallergenes, Antony, France). The involvement of PAR-2 was evaluated using blocking anti-PAR-2 antibody (Santa

Cruz, France). Dexamethasone (Sigma-Aldrich) and Montelukast (Bertin Pharma) were also used.

Primary human bronchial epithelial cells were cultured in an air-liquid interface system. Bronchial epithelial biopsy tissue was dissociated and suspended in bronchial epithelial growth medium (Lonza, Basel, Switzerland) in a flask (0.75 cm²). After confluence cells were plated (200,000 cells per well) on uncoated nucleopore membranes (12-mm diameter inserts, 0.4 µm pore size, Transwell Corning Lowell) in a 1:1 mixture of bronchial epithelial growth medium and DMEM (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) applied at the basal side only to establish the air-liquid interface. Cells were maintained in culture 21 days to obtain a differentiated cell population with a mucociliary phenotype.

Cell Proliferation

Cell proliferation was evaluated using BrdU incorporation as described previously (Roche, Meylan, France)¹⁷. BSM cells were growth arrested in 96-well plates for 24h and stimulated. DNA synthesis was measured using the BrdU kit according to the manufacturer's instructions.

RNA extraction, RT and real-time quantitative PCR

The total RNA was extracted and reverse transcribed into cDNA using AMV reverse transcriptase (Sigma-Aldrich), then real-time quantitative PCR was performed on a Rotor-Gene 2000 (Corbett Research), using appropriate primers designed to target 5LO, FLAP, LTS4S or LTH4S. Their RTPCR expression were presented as an

arbitrary unit and normalized to endogenous references (geometric averaging of the three internal control genes; i.e. YWHAZ, HPRT1, and PO) according to geNorm software.

Cell Synthesis

Levels of leukotriene C4 and proliferative factors were assayed in patient epithelial supernatants by ELISA according the manufacturer's instructions (Cayman, Michigan, US).

Receptor expression

Basal BSM cell expression of CystLT-R1 receptor was measured by flow cytometry. BSM cell were stained with isotype control or CystLT-R1 antibody (Cayman, Michigan, US).

Statistical Analysis

The statistical analysis was performed with NCSS software (NCSS 2001; NCSS statistical Software, Kaysville, UT). Values are presented as the mean \pm the SEM. Statistical significance was analysed by paired *t* tests, Wilcoxon tests, Kruskal-Wallis and the *z* tests, and Bonferroni tests. A *P* value < 0.05 was considered statistically significant.

Bibliography

1. Kroegel, C. Global Initiative for Asthma (GINA) guidelines: 15 years of application. *Expert Rev Clin Immunol* **5**, 239-49 (2009).
2. Siroux, V. et al. Phenotypic determinants of uncontrolled asthma. *J Allergy Clin Immunol* **124**, 681-7 e3 (2009).
3. Lau, S. et al. Early exposure to house-dust mite and cat allergens and development of childhood asthma: a cohort study. Multicentre Allergy Study Group. *Lancet* **356**, 1392-7 (2000).
4. Brussee, J.E. et al. Allergen exposure in infancy and the development of sensitization, wheeze, and asthma at 4 years. *J Allergy Clin Immunol* **115**, 946-52 (2005).
5. Lodge, C.J. et al. House dust mite sensitization in toddlers predicts current wheeze at age 12 years. *J Allergy Clin Immunol* **128**, 782-788 e9 (2011).
6. Gregory, L.G. & Lloyd, C.M. Orchestrating house dust mite-associated allergy in the lung. *Trends Immunol* **32**, 402-11 (2011).
7. Stern, D.A., Morgan, W.J., Halonen, M., Wright, A.L. & Martinez, F.D. Wheezing and bronchial hyper-responsiveness in early childhood as predictors of newly diagnosed asthma in early adulthood: a longitudinal birth-cohort study. *Lancet* **372**, 1058-64 (2008).
8. Barbato, A. et al. Epithelial damage and angiogenesis in the airways of children with asthma. *Am J Respir Crit Care Med* **174**, 975-81 (2006).
9. Turato, G. et al. Nonatopic children with multitrigger wheezing have airway pathology comparable to atopic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* **178**, 476-82 (2008).
10. Payne, D.N. et al. Early thickening of the reticular basement membrane in children with difficult asthma. *Am J Respir Crit Care Med* **167**, 78-82 (2003).
11. Durrani, S.R., Viswanathan, R.K. & Busse, W.W. What effect does asthma treatment have on airway remodeling? Current perspectives. *J Allergy Clin Immunol* **128**, 439-48; quiz 449-50 (2011).
12. Bara, I., Ozier, A., Tunon de Lara, J.M., Marthan, R. & Berger, P. Pathophysiology of bronchial smooth muscle remodelling in asthma. *Eur Respir J* **36**, 1174-84 (2010).
13. Kaminska, M. et al. Airway remodeling in subjects with severe asthma with or without chronic persistent airflow obstruction. *J Allergy Clin Immunol* **124**, 45-51 e1-4 (2009).
14. Ramos-Barbon, D. et al. T Cells localize with proliferating smooth muscle alpha-actin+ cell compartments in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* **182**, 317-24 (2010).
15. Johnson, P.R. et al. Airway smooth muscle cell proliferation is increased in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* **164**, 474-7 (2001).
16. Roth, M. et al. Dysfunctional interaction of C/EBPalpha and the glucocorticoid receptor in asthmatic bronchial smooth-muscle cells. *N Engl J Med* **351**, 560-74 (2004).
17. Trian, T. et al. Bronchial smooth muscle remodeling involves calcium-dependent enhanced mitochondrial biogenesis in asthma. *J Exp Med* **204**, 3173-81 (2007).
18. Miglino, N., Roth, M., Tamm, M. & Borger, P. House dust mite extract downregulates C/EBPalpha in asthmatic bronchial smooth muscle cells. *Eur Respir J* **38**, 50-8 (2011).
19. Wan, H. et al. The transmembrane protein occludin of epithelial tight junctions is a functional target for serine peptidases from faecal pellets of *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Clin Exp Allergy* **31**, 279-94 (2001).
20. Bara, I. et al. Role of YKL-40 in bronchial smooth muscle remodeling in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* **185**, 715-22 (2012).
21. Suzukawa, M. et al. Epithelial cell-derived IL-25, but not Th17 cell-derived IL-17 or IL-17F, is crucial for murine asthma. *J Immunol* **189**, 3641-52 (2012).
22. Yagami, A. et al. IL-33 mediates inflammatory responses in human lung tissue cells. *J Immunol* **185**, 5743-50 (2010).
23. Yao, W. et al. Interleukin-9 is required for allergic airway inflammation mediated by the cytokine TSLP. *Immunity* **38**, 360-72 (2013).

24. Jame, A.J. et al. Human bronchial epithelial cells express an active and inducible biosynthetic pathway for leukotrienes B₄ and C₄. *Clin Exp Allergy* **37**, 880-92 (2007).
25. Profita, M. et al. Cigarette smoke extract activates human bronchial epithelial cells affecting non-neuronal cholinergic system signalling in vitro. *Life Sci* **89**, 36-43 (2011).
26. Gras, D. et al. An ex vivo model of severe asthma using reconstituted human bronchial epithelium. *J Allergy Clin Immunol* **129**, 1259-1266 e1 (2012).
27. Minshall, E. et al. IL-11 expression is increased in severe asthma: association with epithelial cells and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* **105**, 232-8 (2000).
28. Vachier, I. et al. Severe asthma is associated with a loss of LX₄, an endogenous anti-inflammatory compound. *J Allergy Clin Immunol* **115**, 55-60 (2005).
29. Asokanathan, N. et al. House dust mite allergens induce proinflammatory cytokines from respiratory epithelial cells: the cysteine protease allergen, Der p 1, activates protease-activated receptor (PAR)-2 and inactivates PAR-1. *J Immunol* **169**, 4572-8 (2002).
30. Jeong, S.K. et al. Mite and cockroach allergens activate protease-activated receptor 2 and delay epidermal permeability barrier recovery. *J Invest Dermatol* **128**, 1930-9 (2008).
31. Berger, P. et al. Tryptase and agonists of PAR-2 induce the proliferation of human airway smooth muscle cells. *J Appl Physiol (1985)* **91**, 1372-9 (2001).
32. Kawabata, A. et al. Proteinase-activated receptor-2-mediated relaxation in mouse tracheal and bronchial smooth muscle: signal transduction mechanisms and distinct agonist sensitivity. *J Pharmacol Exp Ther* **311**, 402-10 (2004).
33. Yang, G. et al. Transgenic smooth muscle expression of the human CysLT₁ receptor induces enhanced responsiveness of murine airways to leukotriene D₄. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **286**, L992-1001 (2004).
34. Henderson, W.R., Jr. et al. A role for cysteinyl leukotrienes in airway remodeling in a mouse asthma model. *Am J Respir Crit Care Med* **165**, 108-16 (2002).
35. Triantafyllidis, T. et al. RNA interference decreases PAR-2 expression and function in human airway smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* **34**, 49-55 (2006).

Figures legends:

Figure 1:

Bronchial smooth muscle cell proliferation was measured using BrdU incorporation. Cells proliferation was stimulated by either, DMEM, DMEM supplemented with 10% FCS, ALI epithelium supernatant with or without 24h HDM stimulation and HDM incubated for 24h in the incubator before adding on BSM cells (A). BSM cells were obtained from non asthmatic (white bars n=8) or asthmatic patients (black bars n=7) (A). Cells proliferation was stimulated by ALI epithelium supernatant from non asthmatic or asthmatic patient with or without 24h HDM stimulation (B). BSM cell were obtained from non asthmatic (white bars n=4) or asthmatic patients (black bars n=4) (B). The epithelium was previously sensitized for 24h using DMEM (unsensitized), serum of asthmatic patient allergic to HDM, or non allergic (C). BSM cells were obtained from non asthmatic (white bars n=5) or asthmatic patients (black bars n=5) (C). Before HDM stimulation, the epithelium was previously treated or not for 30 minutes with a PAR-2 blocking antibody or an irrelevant antibody (D). BSM cell were obtained from non asthmatic (white bars n=5) or asthmatic patients (black bars n=5) (D). Results are expressed as a fold increase of BrdU incorporation compare to the non proliferative medium DMEM. Data are mean \pm SEM. * indicates P values \leq 0.05 between asthmatic and non asthmatic within an experimental condition using Bonferroni's test. # indicates P values \leq 0.05 between experimental conditions within the same population using paired t tests.

Figure 2:

(A) Bronchial smooth muscle cell proliferation was measured using BrdU incorporation. Cells proliferation was stimulated by either, DMEM, DMEM

supplemented with 10% FCS, ALI epithelium supernatant with or without 24h HDM stimulation. The epithelium was previously treated or not for 30 minutes with increased dexamethasone concentration (10^{-9} M, 10^{-8} M and 10^{-7} M). BSM cells were obtained from non asthmatic (white bars n=4) or asthmatic patients (black bars n=5). Results are expressed as a fold increase of BrdU incorporation compare to the non proliferative medium DMEM. Data are mean \pm SEM. * indicates P values \leq 0.05 between asthmatic and non asthmatic within an experimental condition using Bonferroni's test. # indicates P values \leq 0.05 between experimental conditions within the same population using paired t tests.

(B) Leukotriene C4 production by ALI epithelium was measured in supernatant using ELISA. ALI Epithelium supernatant was collected after 24h with (black bar n=5) or without (white bar n=5) HDM stimulation. Data are mean \pm SEM. * indicates P values \leq 0.05 between no stimulation and HDM stimulation within the same population using paired t tests.

Figure 3:

Induction of leukotriene pathway mRNA after HDM stimulation. mRNA levels were assessed using quantitative RT-PCR. Total ALI epithelium mRNA were collected after 24h with (black bar n=5) or without (white bar n=5) HDM stimulation. Using specific designed primer, mRNA level expression of FLAP (A), 5LO (B), LTC4S (C) and LTA4H (D) was measured. Data are mean \pm SEM. * indicates P values \leq 0.05 between no stimulation and HDM stimulation within the same population using paired t tests.

Figure 4:

(A) Bronchial smooth muscle cell proliferation was measured using BrdU incorporation. Cells proliferation was stimulated by either, DMEM, DMEM supplemented with 10% FCS, ALI epithelium supernatant with or without 24h HDM stimulation. BSM cells were pre treated or not with montelukast before ALI epithelium supernatant stimulation. BSM cell were obtained from non asthmatic (white bars n=5) or asthmatic patients (black bars n=5). Results are expressed as a fold increase of BrdU incorporation compare to the non proliferative medium DMEM. Data are mean \pm SEM. * indicates P values \leq 0.05 between asthmatic and non asthmatic within an experimental condition using Bonferroni's test. # indicates P values \leq 0.05 between conditions within the same population using paired t tests.

(B) Basal BSM cell expression of CystLT-R1 receptor by flow cytometry. BSM cells were stained with isotype control or CystLT-R1 antibody. BSM cell were obtained from non asthmatic (white bars n=5) or asthmatic patients (black bars n=7). Results are expressed as a ratio between mean fluorescence of the isotype control and CystLT-R1 antibody for each patient. Data are mean \pm SEM. * indicates P values \leq 0.05 between asthmatic and non asthmatic using Bonferroni's test.

Figure S1:

Releases of growth factors and cytokines from epithelium were measured in epithelial supernatant using membrane antibody arrays. Epithelial production was measured in the absence (A and B) or in the presence (B) of HDM. Results are express in arbitrary unit of membrane spot density (A) or in density ratio between epithelium stimulated or not with HDM. Measure was done using a mix of an equal volume from 5 different supernatant.

Figure 1

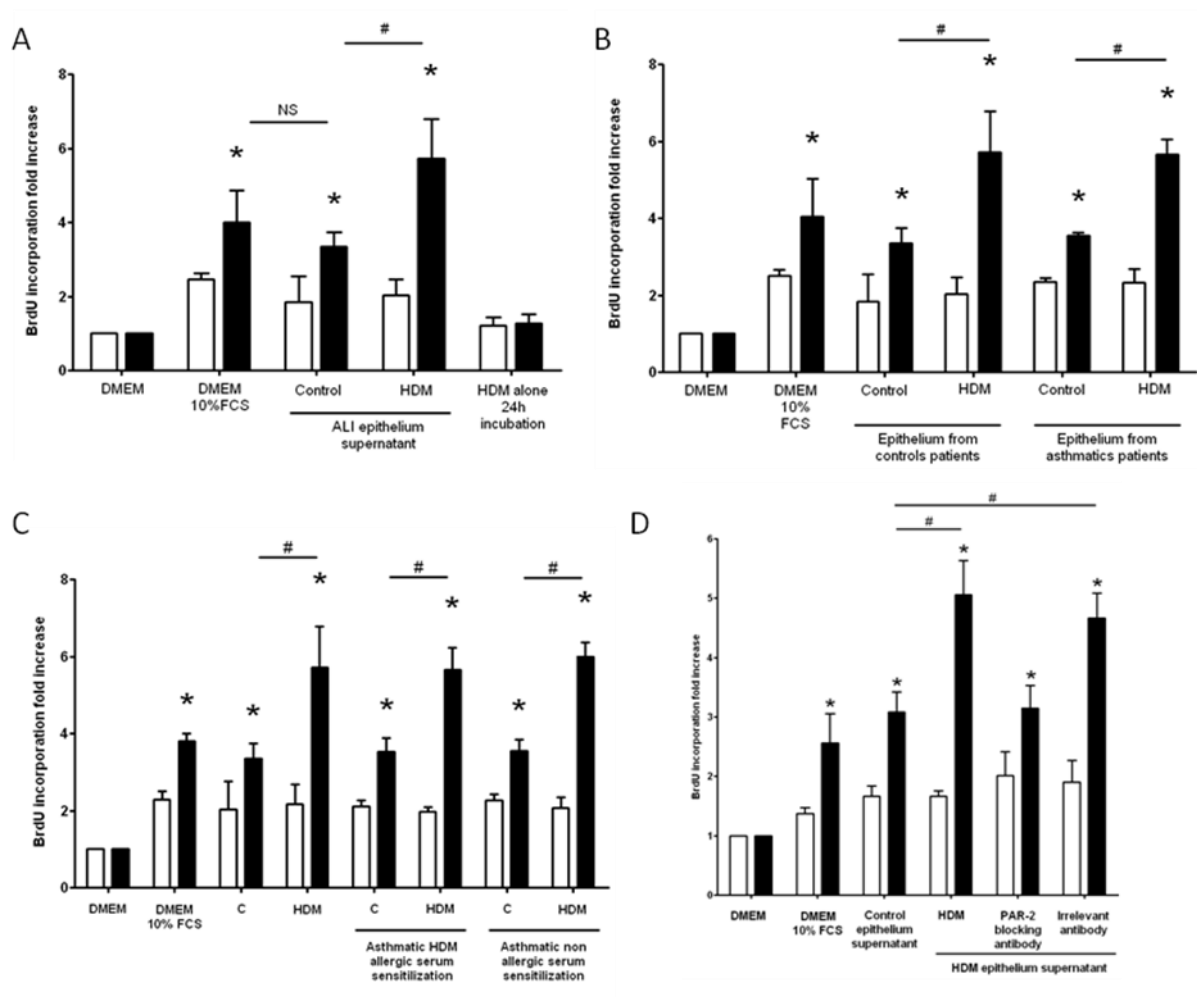


Figure 2

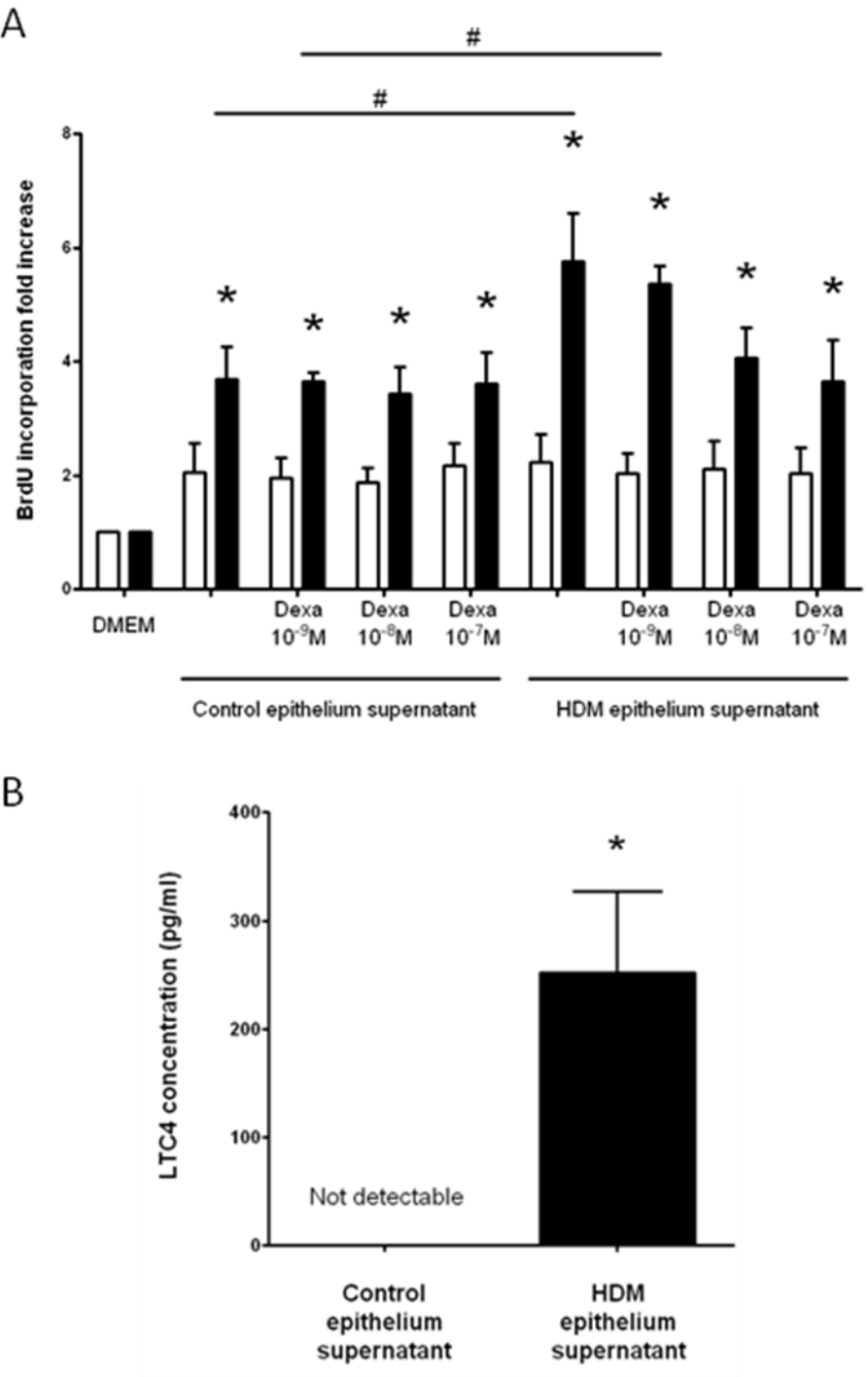


Figure 3

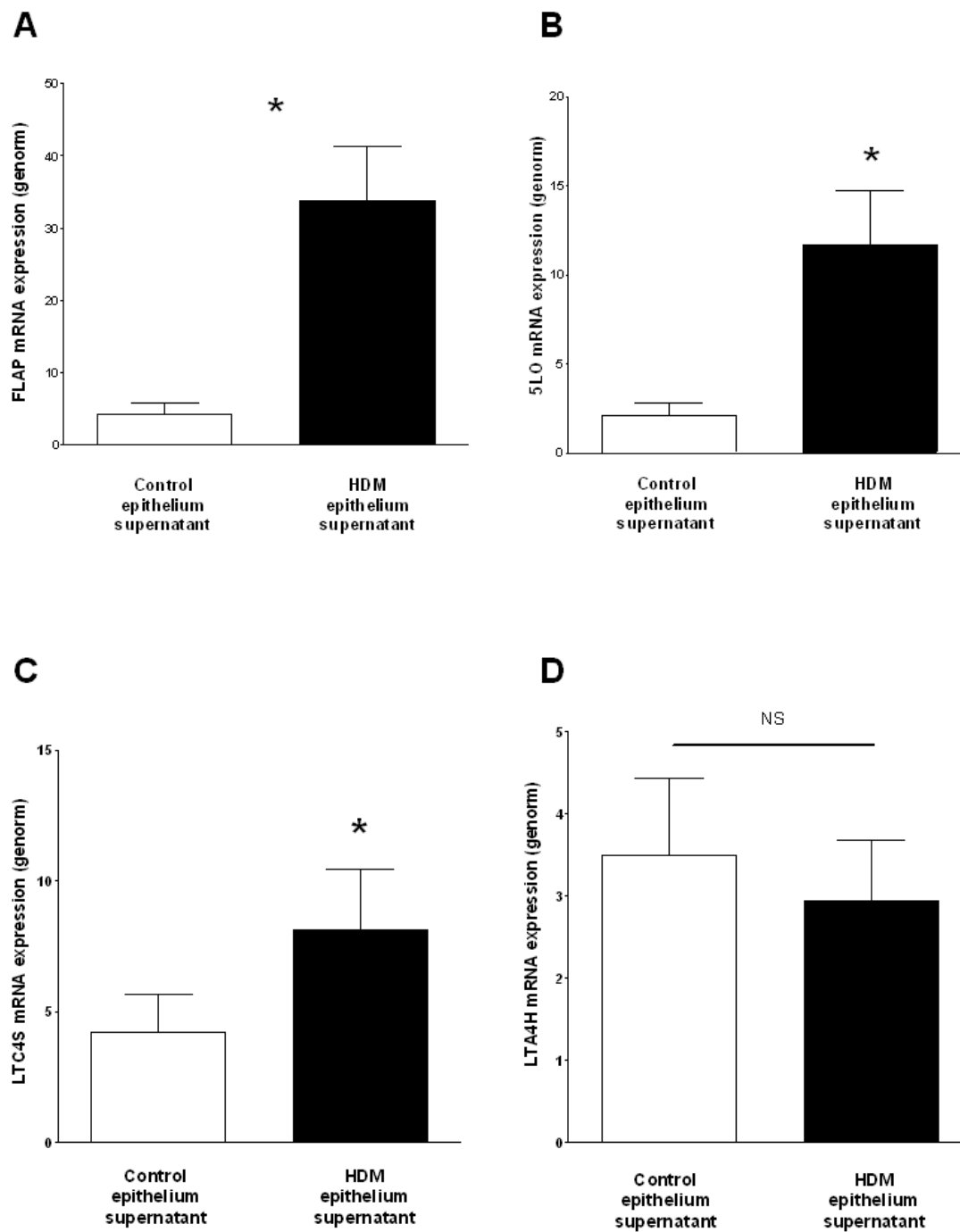
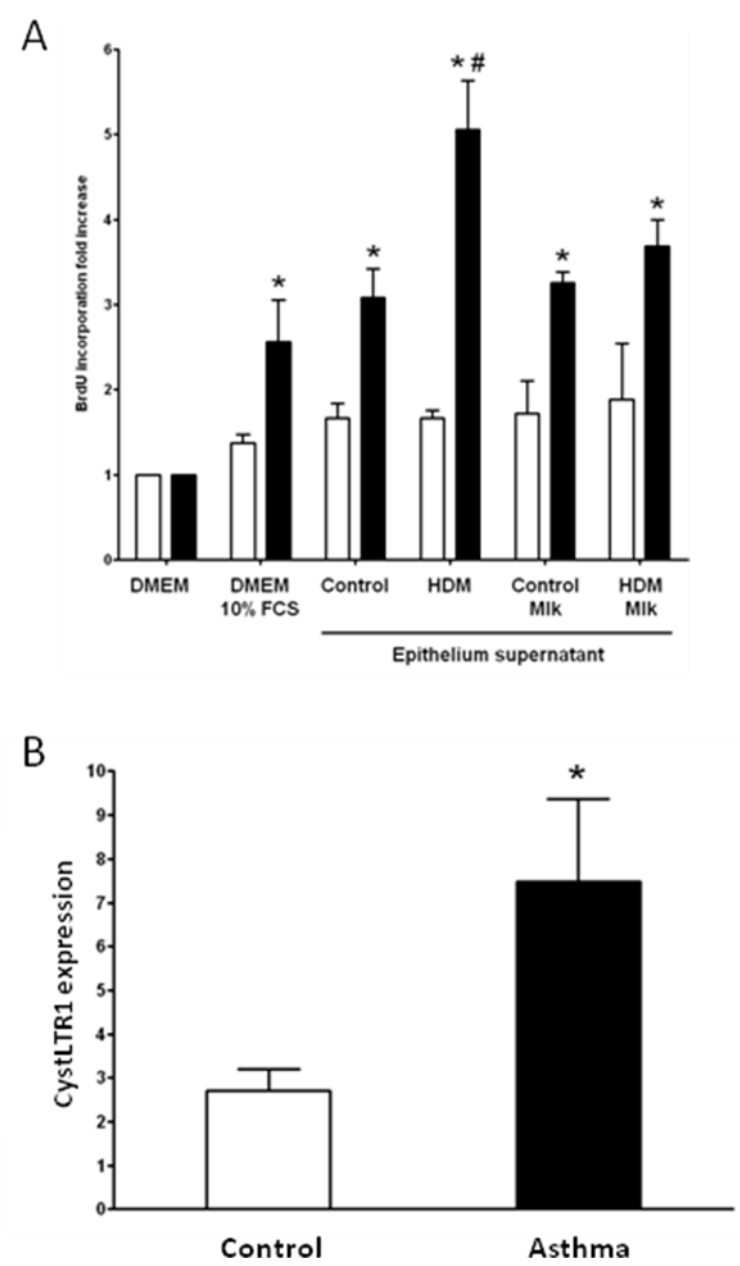
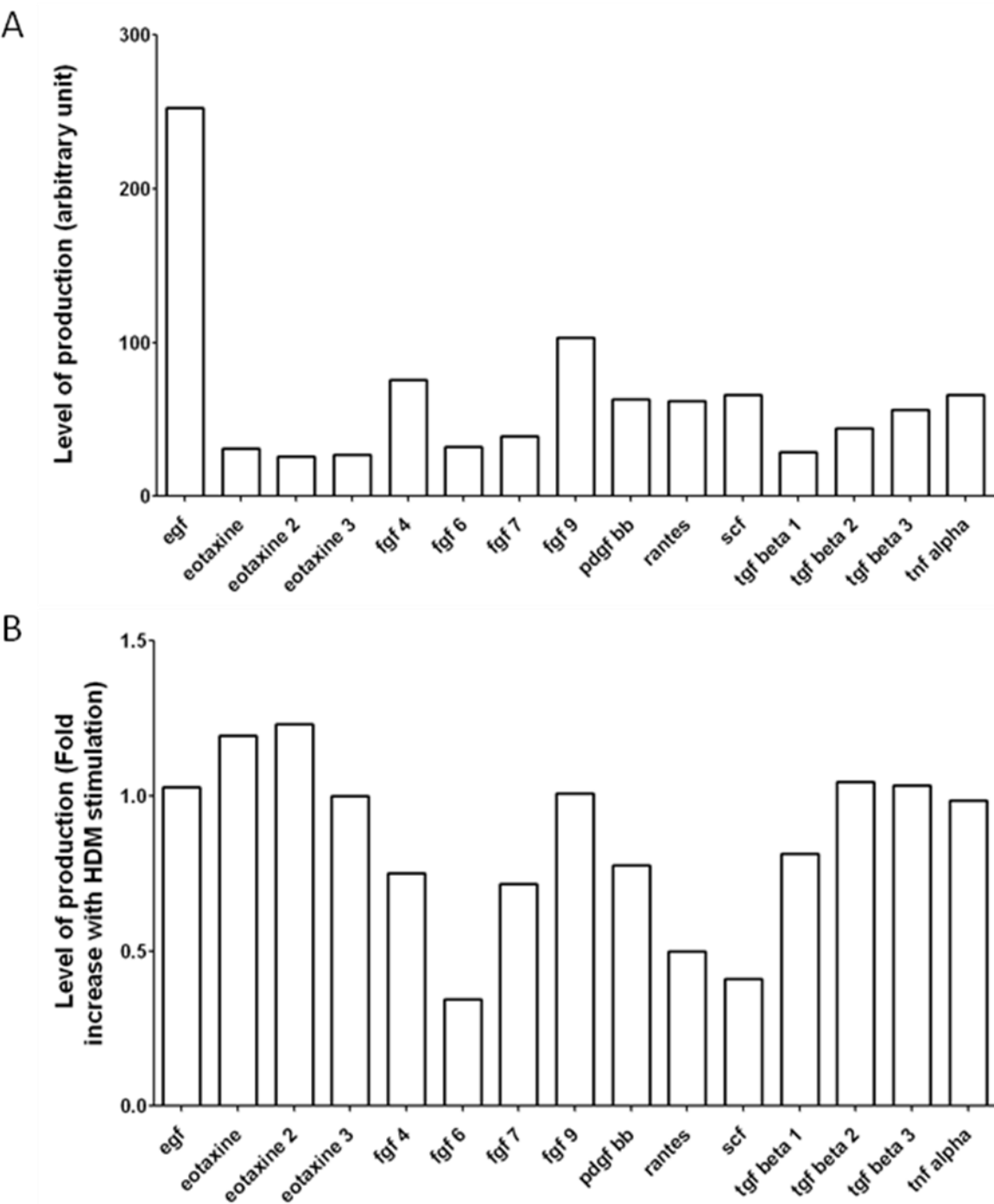


Figure 4



Supplemental Figure 1



Cette étude révèle que l'épithélium primaire en culture ALI, sans être stimulé, induit la prolifération des CML de façon comparable à celle induite par 10% SVF. On retrouve une augmentation de la prolifération des CML d'asthmatiques comparée à celle des témoins. L'épithélium synthétise donc un ensemble de médiateurs proliférants pour le muscle. Les mécanismes responsables de cette sur-prolifération des CML d'asthmatiques font toujours l'objet d'études. L'implication de la biogénèse mitochondriale [253] avait déjà été évoquée, mais dans le cadre du surnageant épithélial, des études supplémentaires sont nécessaires pour comprendre les mécanismes de cet excès de prolifération.

Un autre aspect novateur de cette étude réside dans l'augmentation de la prolifération des seules CML bronchiques d'asthmatiques, après stimulation par le surnageant de l'épithélium stimulé par HDM comparé au surnageant d'épithélium non stimulé. Autrement dit, il semblerait que la stimulation épithéliale des asthmatiques par les acariens de maison soit un facteur aggravant pour le remodelage musculaire lisse bronchique. Ce mécanisme est dépendant du PAR-2 épithélial, sensible aux protéases contenues dans HDM, qui induit la production épithéliale de leucotriènes C4, dont l'expression du récepteur (CysLTR1) est augmentée au niveau des CML d'asthmatiques. D'autres pistes peuvent être étudiées. Récemment, dans un modèle murin sensibilisé par HDM, le blocage de l'IL-25 a permis de diminuer l'hyperplasie des CML, ainsi que d'autres paramètres du remodelage [163].

D'une part, ces résultats devraient être complétés sur un modèle murin [261], afin de vérifier que la production de leucotriènes par l'épithélium peut être indépendante de l'inflammation. D'autre part, l'augmentation du CysLTR1 observée au niveau des CML d'asthmatiques *in vitro* devra être confirmée *ex vivo* par immunohistochimie.

I – C – Étude des interactions neutrophiles-cellules musculaires lisses bronchiques

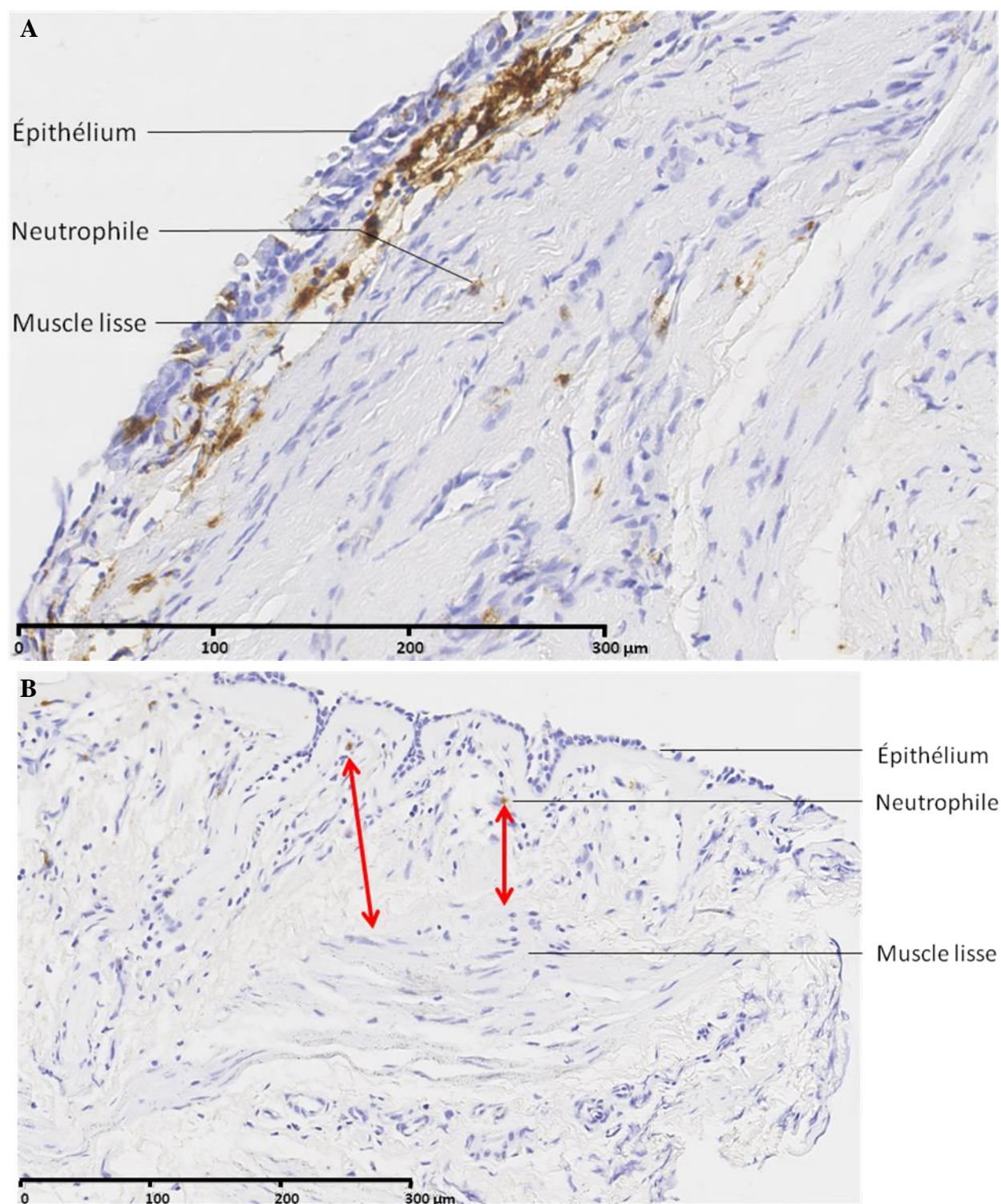
Parmi les activateurs du PAR-2, nous avons déjà cité YKL-40. Cette chitinase-like principalement produite par l'épithélium a aussi été observée dans les granules des neutrophiles [130]. Cependant, bien que des études sur l'implication d'YKL-40 dans l'asthme suggèrent qu'elle soit aussi d'origine neutrophilique (cf chapitre I-A-2-b), aucune d'entre-elles ne démontre clairement un co-marquage ou une production *in vitro* d'YKL-40 par les neutrophiles. Le neutrophile est, de plus, capable d'activer le PAR-2 sous l'action de son élastase. L'élastase du neutrophile (NE) est à l'origine d'effets agonistes sur les CML (cf chapitre I-A-2-b). Cependant, d'un point de vue physiologique, l'infiltration des neutrophiles dans le muscle lisse bronchique des asthmatiques sévères n'a jamais été mise en évidence, mais de nombreuses études en sous-entendent la possibilité (cf chapitre I-A-2-b).

Avant de poursuivre l'étude des effets des médiateurs neutrophiliques, dont la NE, sur les CML d'asthmatiques, nous avons voulu clarifier la localisation des neutrophiles dans les bronches d'asthmatiques sévères et vérifier l'hypothèse d'une infiltration de neutrophiles dans le muscle lisse bronchique.

I – C – 1 – Localisation des neutrophiles dans les bronches d'asthmatiques sévères

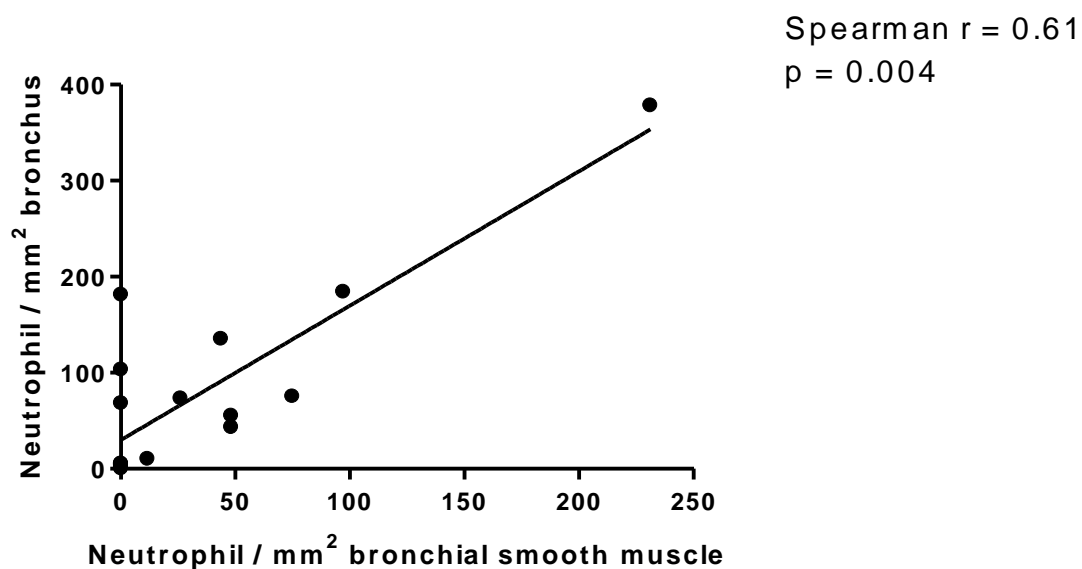
Sur 36 biopsies bronchiques d'asthmatiques sévères (non fumeurs), 17 patients ont eu des lames analysables, marquées avec l'anticorps anti-NE. Après analyse, nous pouvons confirmer la présence, chez certains asthmatiques sévères, de neutrophiles au niveau des bronches, plus précisément infiltrant le muscle lisse (Figure 20). Le nombre de neutrophiles dans la bronche est corrélé au nombre de neutrophiles infiltrant le muscle (Figure 21).

Figure 20 : Immunohistochimie de l'élastase du neutrophile



Légende : A : coupe bronchique d'asthmatique sévère avec une infiltration à neutrophiles dans le muscle lisse. B : autre coupe d'asthmatique sévère avec des neutrophiles en dehors du muscle. Les flèches rouges représentent la distance la plus courte entre le neutrophile et le muscle.

Figure 21 : Corrélation entre le nombre de neutrophiles dans la bronche et dans le muscle



Pour étudier l'inflammation neutrophile de notre population, nous avons décidé de la séparer en deux groupes homogènes selon le critère de l'obstruction bronchique. Ainsi nous obtenons 9 asthmatiques sévères avec un VEMS > 75% et 8 avec un VEMS < 70% (Tableau 15).

Tableau 15 : Caractéristiques cliniques des asthmatiques sévères

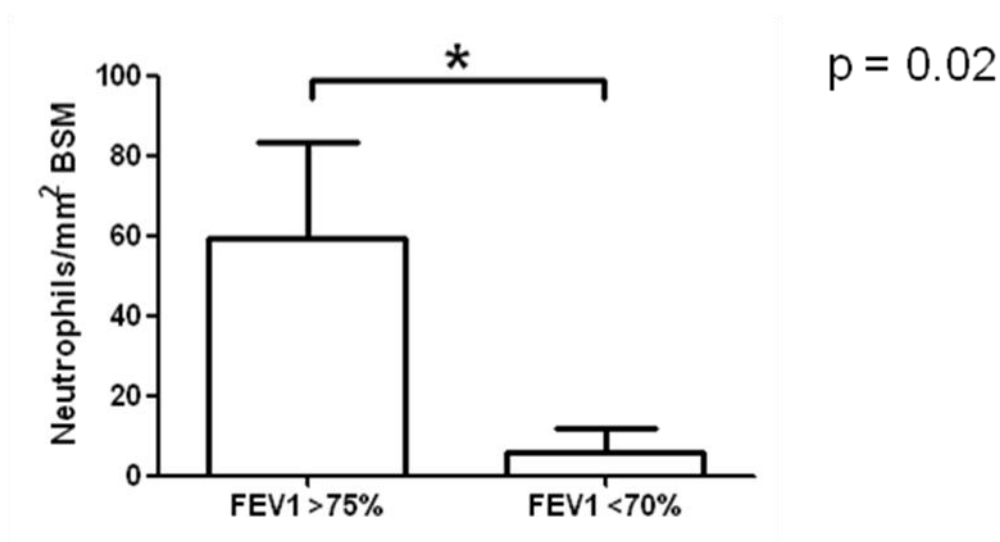
Characteristics	FEV ₁ >75% Th	FEV ₁ <70% Th	P value
No. of patients	9	8	
Sex (M/F)	2 / 7	2 / 6	
Median age (year)	52 ± 16	55 ± 11	0.66
BMI (kg/m ²)	27.7 ± 4.2	27.6 ± 8.1	0.97
ICS (n patients)	9	8	
Dose of ICS (µg/d)	3050 ± 1020	3750 ± 1982	0.37
LABA (n patients)	9	8	
OCS (n patients)	0	4	
OCS (mg/d)		41 ± 27	
FEV ₁			
Liters	2.4 ± 0.5	1.3 ± 0.4	0.0002
% of predicted value	92.2 ± 16.8	50.8 ± 15.4	0.0001
FEV ₁ : FVC ratio (% of FVC)	74.1 ± 6.9	58.2 ± 11.1	0.0027
PF (Liters/min)	362 ± 74	237 ± 55	0.0014
FeNO (ppb)	30.7 ± 31.8	29.3 ± 21.8	0.92

Data are mean ± SD. BMI: body mass index. FEV₁: forced expiratory volume in one second. FVC: forced vital capacity. FEF 25-75: forced expiratory flow between 25 and 75% of FVC. ICS: inhaled corticosteroïde. LABA: long-acting β-2 agonist. OCS: oral corticosteroïde. PF: peak flow. * : p< 0.05 using unpaired t test

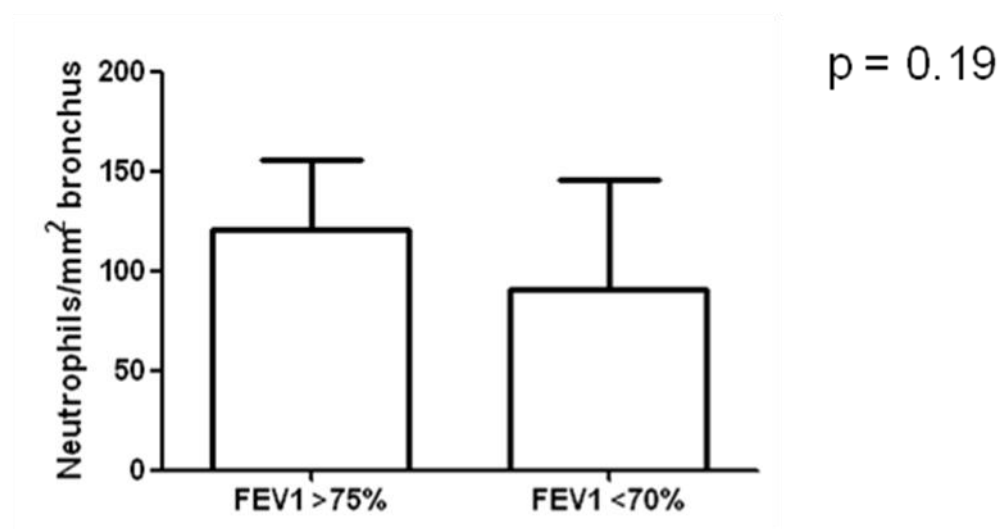
De façon totalement inattendue, nous avons trouvé que les asthmatiques sévères avec un VEMS > 75% ont d'avantage de neutrophiles dans le muscle (Figure 22A). Malgré la corrélation observée entre le nombre de neutrophiles dans la bronche et dans le muscle, le nombre de neutrophiles dans la bronche n'est pas différent entre nos deux populations (Figure 22B).

Figure 22 : Nombre de neutrophiles dans la bronche et dans le muscle

A

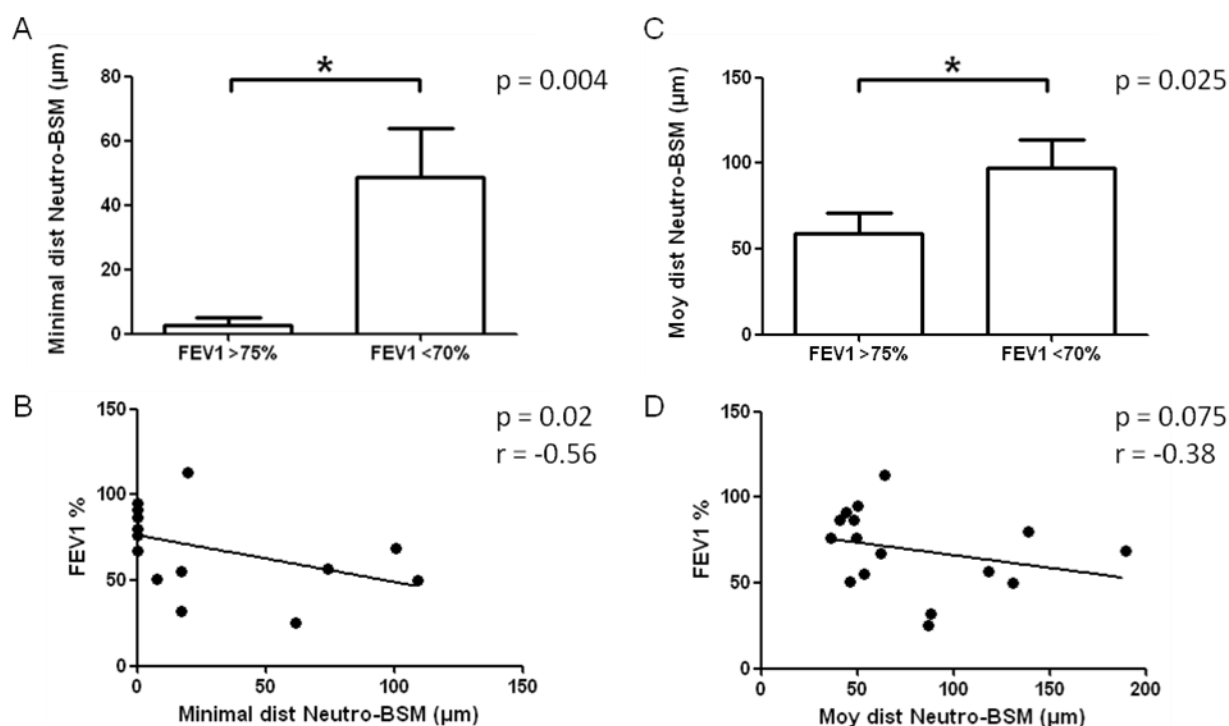


B



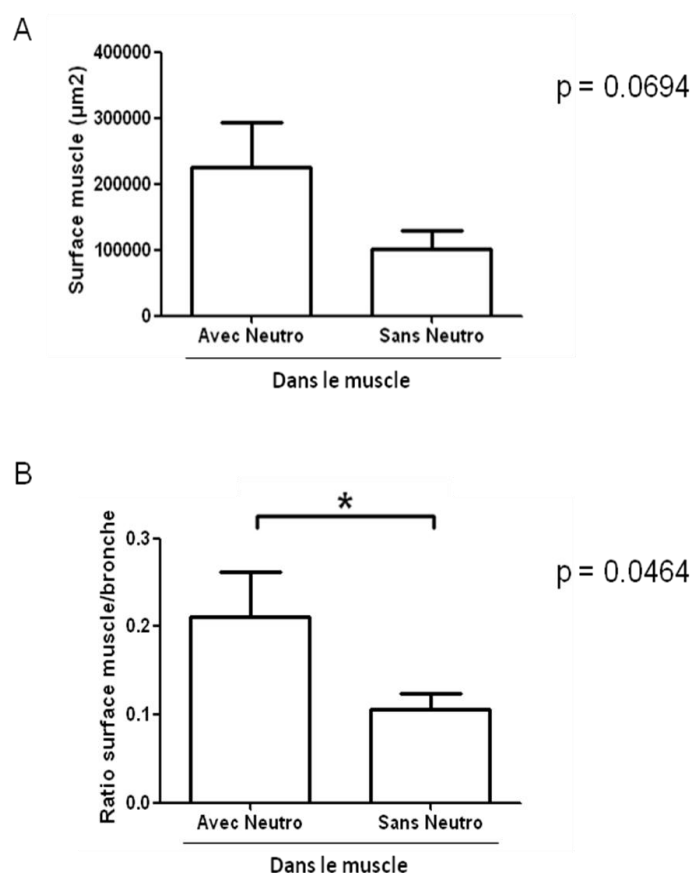
Etant donné que les asthmatiques sévères ne présentent pas tous des neutrophiles dans le muscle mais à proximité du muscle, nous avons mesuré la distance la plus courte entre le neutrophile et le muscle lisse (cf flèche rouge de la figure 20B). Ainsi le résultat observé dans la figure 22A est très proche du résultat de la figure 23A. Chez les patients avec un VEMS > 75%, la distance minimale entre le neutrophile et le muscle est plus courte que chez les patients avec un VEMS < 70%. De plus, il existe une corrélation négative entre le VEMS et cette distance minimale (Figure 23B). Lorsque l'on considère la moyenne des distances observées entre chaque neutrophile et le muscle, on retrouve le même résultat qu'auparavant mais il n'y a plus de corrélation significative (Figure 23C et D).

Figure 23 : Corrélations et distance minimale ou moyenne entre les neutrophiles et le muscle lisse bronchique



Nous avons également séparé ces mêmes asthmatiques sévères selon la présence ou l'absence de neutrophiles dans le muscle lisse. On observe une augmentation de la masse du muscle lisse chez les asthmatiques sévères avec des neutrophiles dans le muscle par rapport aux asthmatiques sévères sans neutrophiles dans le muscle (Figure 24).

Figure 24 : Taille du muscle en fonction de la présence de neutrophiles dans le muscle

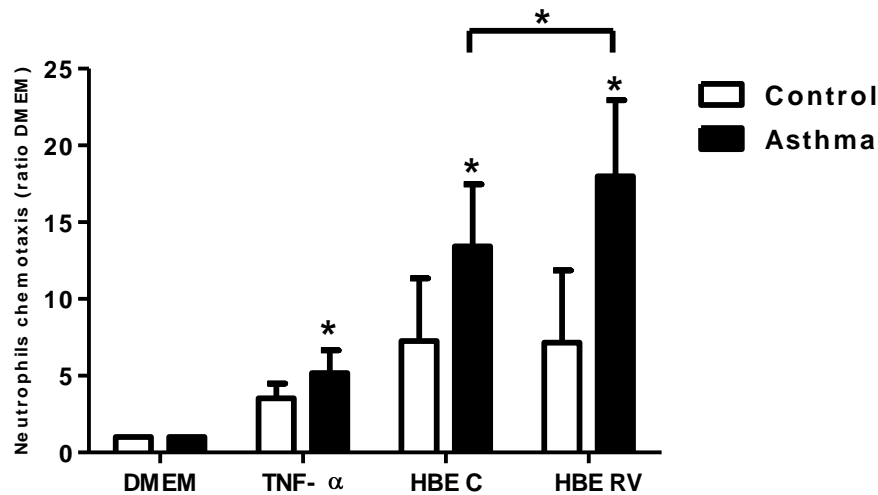


D'autres données cliniques sont en cours d'analyse dans ces 2 populations, notamment le nombre d'exacerbations avant le prélèvement bronchique ou le nombre de jours entre la dernière exacerbation et le prélèvement bronchique. Sur le plan radiologique, des données reflétant l'épaisseur des parois bronchiques sont en cours d'analyse.

I – C – 2 – Migration des neutrophiles

Après avoir confirmé la présence de neutrophiles dans certains muscles lisses bronchiques d'asthmatiques sévères, nous avons voulu définir les conditions expérimentales permettant d'étudier le chimiotactisme des neutrophiles induit par les CML bronchiques. Le principal chémoattractant des neutrophiles est l'IL-8. La stimulation des CML bronchiques par le TNF- α est connue pour induire la production d'IL-8 [262]. Nous sommes donc partis de cette condition pour réaliser les mises au point. Ensuite, les conditions expérimentales se rapprochant d'une infection à rhinovirus ont été testées. Ainsi, après avoir infecté des HBE (Human Bronchial Epithelial cells) avec le rhinovirus HRV-16, le surnageant épithélial est exposé aux UV afin d'inactiver les virus, puis utilisé pour stimuler les CML bronchiques de témoins et d'asthmatiques. Les résultats de chimiotactisme (Figure 25) montrent que la stimulation des CML bronchiques par du surnageant épithélial induit un chimiotactisme plus important comparé à celui induit après stimulation directe des CML par le TNF- α . Cette augmentation est plus prononcée lorsque la CML est d'origine asthmatique. De plus, quand l'épithélium est infecté par le rhinovirus, le chimiotactisme est augmenté uniquement dans le cas des CML d'asthmatiques. Le même surnageant épithélial mis à l'incubateur pendant 24h, sans CML, n'induit pas de chimiotactisme ou très peu (résultats non montrés). Donc, l'origine du chimiotactisme observé ne peut être dû qu'à la production de médiateurs par les CML.

Figure 25 : Chimiotactisme des neutrophiles

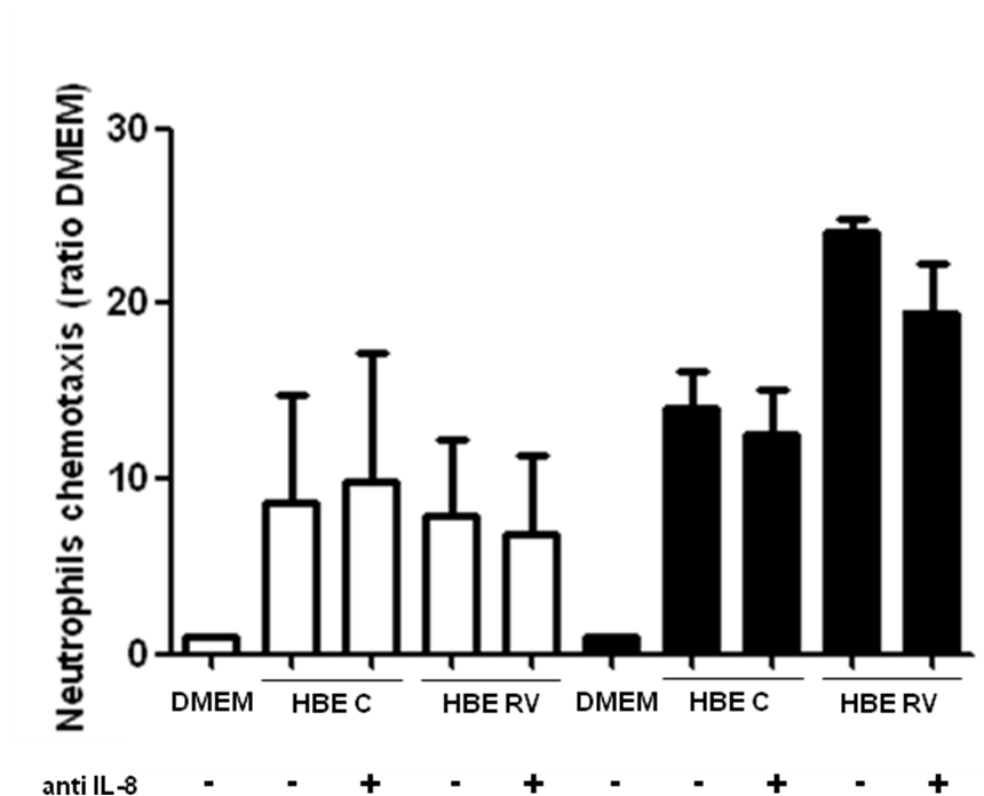


Légende : Les résultats sont exprimés en ratio du chimiotactisme des neutrophiles par le surnageant de CML non stimulées (DMEM). HBE C : surnageant de CML stimulées par le surnageant d'HBE non infecté ; HBE RV : surnageant de CML stimulées par le surnageant d'HBE infecté avec HRV-16. TNF- α : surnageant de CML stimulées par du Tumor Necrosis Factor- α . Barre blanche : n = 4 témoins ; Barre noire : n = 5 asthmatiques. * : $p < 0.05$ avec un test Wilcoxon.

Ces résultats doivent être confirmés en utilisant de l'épithélium primaire en ALI.

Pour savoir quel est le rôle de l'IL-8 dans le chimiotactisme induit par l'épithélium infecté ou non, la même expérience a été réalisée en utilisant un anticorps bloquant l'IL-8 (Figure 26).

Figure 26 : Chimiotactisme des neutrophiles et anticorps bloquant l'IL-8



Légende : Identique à la figure 24, avec en plus l'anticorps bloquant l'IL-8. Barre blanche : n = 2 témoins ; Barre noire : n = 2 asthmatiques. Pas de test statistique possible.

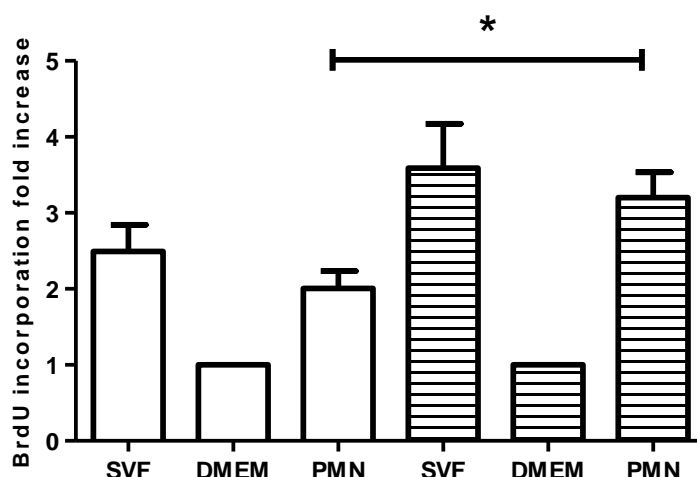
Ces résultats préliminaires suggèrent que l'IL-8 n'est pas le chémoattractant principal produit par les CML stimulées par l'épithélium. En revanche, une partie de l'augmentation du chimiotactisme des neutrophiles lors de l'infection rhinovirale via les CML d'asthmatiques semble être liée à l'IL-8. Il existe beaucoup d'autres candidats possibles, notamment CXCL5 (ENA-78), connu pour être produit par l'épithélium lors d'une infection rhinovirale [263]. Jarai et al ont montré que la stimulation des CML par l'IL-1 β , une cytokine pro-inflammatoire libérée par l'épithélium infecté par des rhinovirus [264], induit les gènes de cytokines/chimiokines incluant CXCL-8 (IL-8), CXCL1 , -2, -3 (GRO- α , - β , - γ), CXCL5 (ENA-78), et CCL2, -8, -7 (MCP-1, -2 et -3) [265].

I – C – 3 – Effets des médiateurs neutrophiliques sur les CML

D'une part, nous avons confirmé l'existence d'une infiltration de neutrophiles au niveau du muscle lisse bronchique, d'autre part, nous nous sommes assurés que les CML bronchiques étaient capables d'attirer les neutrophiles *in vitro*. Nous avons ensuite essayé d'identifier les effets de l'interaction neutrophile/muscle lisse bronchique.

Dans une expérience de prolifération (BrdU), la stimulation des CML de témoins avec des neutrophiles induit une prolifération qui augmente lorsque les CML ont été transduites avec un lentivirus permettant la surexpression de PAR-2 (Figure 27).

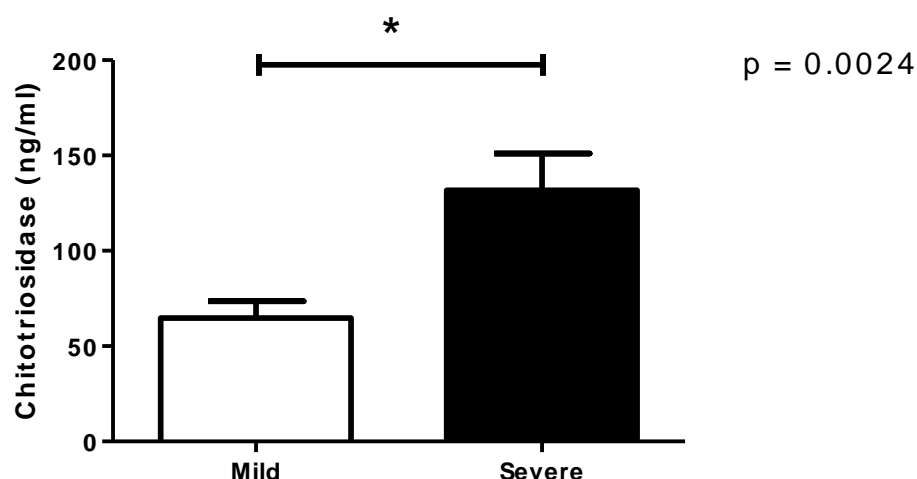
Figure 27 : Les neutrophiles induisent la prolifération des CML



Légende : les résultats sont exprimés en ratio d'incorporation de BrdU en condition DMEM. SVF : les CML ont été stimulées avec du milieu supplémenté avec 10% de SVF. PMN : les CML ont été stimulées avec une solution de neutrophiles (1000 neutrophiles/100µl/puits). Barres blanches : n = 4 témoins ; Barres blanches rayées : n = 4 témoins surexprimant PAR-2. * : $p < 0.05$ avec un test Mann & Whitney.

La chitotriosidase est une chitinase décrite pour la première fois dans la maladie de Gaucher [266]. Elle est produite essentiellement par les macrophages mais les neutrophiles peuvent aussi la produire. Nous nous sommes intéressés à cette enzyme car elle est augmentée dans le sérum des asthmatiques sévères (figure 28) et est connue pour participer aux fibroses hépatiques [267]. Les résultats préliminaires montrent que cette enzyme a peu d'effet sur le remodelage bronchique (prolifération, migration et synthèse de matrice extracellulaire) (résultats non montrés).

Figure 28 : Augmentation du niveau de chitotriosidase dans le sérum des asthmatiques sévères



Légende : Niveau de chitotriosidase dans le sérum. Barre blanche : n = 30 asthmatiques légers. Barre noire : n = 10 asthmatiques sévères. * : p < 0.05 avec un test Mann & Whitney.

De plus, la stimulation des CML par la chitotriosidase n'induit pas d'effet chimiotactique des neutrophiles (résultats non montrés).

Nous nous sommes donc intéressés au principal médiateur neutrophilique: la NE (cf chapitre I-A-2-b). Dans la littérature, elle aurait un rôle proliférant à de faibles concentrations et induirait l'apoptose pour des concentrations plus fortes. Le mécanisme de prolifération a été identifié par l'activation du PAR-2 induisant la voie des MAPK [129]. Nous avons donc testé le pouvoir proliférant de la NE sur des CML de témoins et d'asthmatiques. Malheureusement, les concentrations testées étaient trop fortes et induisaient l'apoptose (résultats non montrés). Des expériences complémentaires avec des gammes de concentrations plus faibles sont nécessaires.

Tout comme la chitotriosidase, la stimulation des CML par la NE n'induit pas d'effet chémoattractant sur les neutrophiles (résultats non montrés).

Au total, certains asthmatiques sévères présentent une infiltration du muscle lisse bronchique par les neutrophiles, et ces asthmatiques sont plutôt moins obstructifs. Le muscle lisse bronchique peut induire la migration des neutrophiles lorsqu'il est stimulé par un épithélium infecté par le HRV-16. Le neutrophile peut induire une prolifération du muscle lisse bronchique qui semble PAR-2 dépendante. Les conditions optimales de l'induction de la prolifération par la NE sont encore à déterminer pour identifier une éventuelle différence de réponse entre les CML de témoins et d'asthmatiques. De plus, YKL-40, une autre protéase du neutrophile, pourrait participer à cette prolifération du muscle lisse bronchique, comme cela a été montré précédemment [131].

Certaines questions restent sans réponse : Comment la présence de neutrophiles au sein même du muscle lisse bronchique pourrait être bénéfique ? Comment expliquer que ces asthmatiques soient moins obstructifs ? Est-ce vraiment en lien avec les neutrophiles ?

D'une part, les neutrophiles sont aussi capables de libérer de la PGE2 [268], un anti-inflammatoire et relaxant du muscle, qui peut aussi inhiber la prolifération des CML [269] et d'autre part, la NE (ainsi que la cathepsine G et la protéinase 3) sont capables de « désarmer » le PAR-2 [129], rendant l'action de la tryptase inefficace.

CHAPITRE IV :

Conclusions et

Perspectives

La CML a un rôle pivot dans la physiopathologie de l'asthme. En effet, elle participe activement aux 3 caractéristiques principales de la maladie : l'hyperréactivité, l'inflammation et le remodelage bronchique. Dans ce travail de thèse, nous avons pu mettre en avant l'implication du PAR-2 dans une composante majeure du remodelage bronchique : la prolifération musculaire lisse. Ce RCPG est la cible de nombreux médiateurs. Globalement, l'activation de ce récepteur au niveau musculaire lisse entraîne une prolifération cellulaire qui peut conduire à une augmentation de la masse du muscle lisse bronchique, corrélée au déclin de la fonction respiratoire [1].

Dans le travail sur le PAR-2 musculaire, on a vu que ce n'est pas tant le niveau d'expression qui est important mais bel et bien la fréquence de son activation qui va placer le PAR-2 parmi les facteurs aggravants de la maladie. Toutefois nos résultats d'expression *in vitro* ne sont pas en accord avec les résultats *ex vivo* de Knight et al. Pour clarifier ces données, une étude devra être menée sur différents groupes d'asthmatiques dont le phénotype aura été déterminé. Le niveau d'expression du PAR-2 pourrait être modifié selon le critère de sévérité, ou plus précisément du statut inflammatoire et infectieux du patient. En effet, il a été montré chez la souris, que le PAR-2 épithélial peut augmenter après une infection virale [179].

Concernant le PAR-2 épithélial, bien que sa participation à la relaxation bronchique soit largement décrite, nous avons démontré que son activation par les acariens avait finalement un impact négatif sur le muscle lisse, avec une augmentation de la prolifération des CML. Dans cette étude, nous avons aussi montré que la production basale de l'épithélium en culture ALI est capable de faire proliférer les CML. Ces médiateurs épithéliaux qui sont des mitogènes de la CML devront être identifiés. L'amphiregulin et HB-EGF (heparin-binding epidermal growth factor) pourraient être de bons candidats [270].

Concernant l'inflammation à neutrophiles, nous avons confirmé leur présence au sein même du muscle lisse bronchique de certains asthmatiques sévères. Dès lors, nous avons pu constater que l'interaction des neutrophiles avec les CML induit la prolifération de ces dernières. D'après les éléments de la littérature et d'après nos résultats expérimentaux, il semble que cette prolifération soit induite par l'activation du PAR-2, probablement par l'élastase. Pour compléter les résultats de chimiotactisme *in vitro*, des mises au point d'immunohistochimie sont en cours pour évaluer la présence de rhinovirus dans les bronches étudiées, afin de voir s'il existe un lien avec le niveau de neutrophiles bronchiques.

De la même façon que la myosite mastocytaire, l'agression de l'épithélium et l'inflammation à neutrophiles sont sujettes à la chronicité. L'identification des produits libérés au cours de ces stimulations répétées est nécessaire, afin d'en étudier les effets sur le remodelage musculaire lisse bronchique. Dans cette optique, il serait pertinent d'étudier les effets de l'activation répétée des CML par YKL-40, mais aussi par le TSLP, tous deux produits par l'épithélium et participant au remodelage bronchique. De plus, il existe un intérêt grandissant pour la cytokine TSLP capable d'activer les mastocytes ainsi que les cellules dendritiques, aboutissant à une inflammation de type TH2 [271]. Cette cytokine est aussi produite par l'épithélium lors d'une infection rhinovirale [272], au même titre que l'IL-8 (CXCL8), l'IL-6, ENA-78 (CXCL5), HBD-2 (Human β défensin-2), l'IL-1 α , -1 β , GM-CSF, l'Eotaxin, (CCL11), RANTES (CCL5), l'IP-10 (CXCL10), MIP-1 α (CCL3), LTC₄, l'IFN- β 1, - λ et le TNF- α [250, 263, 264, 273, 274, 275, 276, 277]. Tous ces facteurs de l'inflammation méritent d'être étudiés en condition chronique sur les CML, pour mettre en évidence leur impact sur le remodelage bronchique. De plus, certains de ces médiateurs pourraient induire la production par la CML de facteurs chémoattractants des neutrophiles, comme le TNF- α qui induit la production d'IL-8. Ainsi une éventuelle boucle d'autoactivation pourrait être mise en évidence. Elle commencerait avec l'infection de

l'épithélium par le HRV-16, puis les médiateurs inflammatoires libérés par l'épithélium agiraient sur le muscle lisse bronchique, entraînant sa prolifération, et surtout la production de facteurs chémoattractants. La cellule inflammatoire recrutée au niveau du muscle pourrait alors libérer des facteurs aggravant le remodelage et/ou entretenir l'inflammation en stimulant les CML.

Dans le même ordre d'idée, il serait pertinent d'étudier la production des cytokines Th17 par l'épithélium lors d'une infection rhinovirale. En effet il a été montré que l'IL-17-A et -F induisent la migration [71] et la prolifération [72] des CML. Elles induisent aussi la production d'IL-8 par les CML [278]. On peut donc se demander s'il existe une inflammation Th17 neutrophilique capable d'induire une boucle d'autoactivation.

Le PAR-2 fait aussi l'objet d'intenses recherches dans le cancer [279], où son inhibition aurait un intérêt thérapeutique. En effet, il est exprimé dans de nombreux cancers et joue un rôle important dans la progression des tumeurs et des métastases. D'ailleurs il serait original de considérer les CML d'asthmatiques comme des cellules proliférantes « cancéreuses », qui pourraient partager le caractère d'une inhibition de l'apoptose.

Références

bibliographiques

1. Kaminska, M., et al., *Airway remodeling in subjects with severe asthma with or without chronic persistent airflow obstruction*. J Allergy Clin Immunol, 2009. **124**(1): p. 45-51 e1-4.
2. GINA, *Global Initiative for Asthma. Global strategy for asthma management and prevention*. Available from: www.ginasthma.com. . 2012.
3. Masoli, M., et al., *The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report*. Allergy, 2004. **59**(5): p. 469-78.
4. Godard, P., et al., *Costs of asthma are correlated with severity: a 1-yr prospective study*. Eur Respir J, 2002. **19**(1): p. 61-7.
5. Garbe, B.R. and T.T. Chapman, *Asthma: the beginner's guide to spirometry techniques*. Occup Health (Lond), 1989. **41**(3): p. 76-7.
6. *Proceedings of the ATS workshop on refractory asthma: current understanding, recommendations, and unanswered questions*. American Thoracic Society. Am J Respir Crit Care Med, 2000. **162**(6): p. 2341-51.
7. Crapo, R.O., et al., *Guidelines for methacholine and exercise challenge testing-1999. This official statement of the American Thoracic Society was adopted by the ATS Board of Directors, July 1999*. Am J Respir Crit Care Med, 2000. **161**(1): p. 309-29.
8. Popa, V., *ATS guidelines for methacholine and exercise challenge testing*. Am J Respir Crit Care Med, 2001. **163**(1): p. 292-3.
9. Magnussen, H., et al., *Noninvasive methods to measure airway inflammation: future considerations*. Eur Respir J, 2000. **16**(6): p. 1175-9.
10. Shaw, D.E., et al., *The use of exhaled nitric oxide to guide asthma management: a randomized controlled trial*. Am J Respir Crit Care Med, 2007. **176**(3): p. 231-7.
11. Kharitonov, S.A., et al., *Increased nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients*. Lancet, 1994. **343**(8890): p. 133-5.
12. Kharitonov, S.A. and P.J. Barnes, *Does exhaled nitric oxide reflect asthma control? Yes, it does!* Am J Respir Crit Care Med, 2001. **164**(5): p. 727-8.
13. Payne, D.N., et al., *Relationship between exhaled nitric oxide and mucosal eosinophilic inflammation in children with difficult asthma, after treatment with oral prednisolone*. Am J Respir Crit Care Med, 2001. **164**(8 Pt 1): p. 1376-81.
14. Pizzichini, M.M., et al., *Spontaneous and induced sputum to measure indices of airway inflammation in asthma*. Am J Respir Crit Care Med, 1996. **154**(4 Pt 1): p. 866-9.
15. Leynaert, B., et al., *Association between asthma and rhinitis according to atopic sensitization in a population-based study*. J Allergy Clin Immunol, 2004. **113**(1): p. 86-93.
16. Laitinen, L.A., A. Laitinen, and T. Haahtela, *A comparative study of the effects of an inhaled corticosteroid, budesonide, and a beta 2-agonist, terbutaline, on airway inflammation in newly diagnosed asthma: a randomized, double-blind, parallel-group controlled trial*. J Allergy Clin Immunol, 1992. **90**(1): p. 32-42.
17. GINA, *Global Initiative for Asthma. Global strategy for asthma management and prevention*. 1995.
18. Juniper, E.F., et al., *Development and validation of a questionnaire to measure asthma control*. Eur Respir J, 1999. **14**(4): p. 902-7.
19. Juniper, E.F., et al., *Measuring asthma control. Clinic questionnaire or daily diary?* Am J Respir Crit Care Med, 2000. **162**(4 Pt 1): p. 1330-4.

20. Nathan, R.A., et al., *Development of the asthma control test: a survey for assessing asthma control*. J Allergy Clin Immunol, 2004. **113**(1): p. 59-65.
21. Djukanovic, R., et al., *Effects of treatment with anti-immunoglobulin E antibody omalizumab on airway inflammation in allergic asthma*. Am J Respir Crit Care Med, 2004. **170**(6): p. 583-93.
22. Wechsler, M.E., et al., *Novel targeted therapies for eosinophilic disorders*. J Allergy Clin Immunol, 2012. **130**(3): p. 563-71.
23. Corren, J., *Role of Interleukin-13 in Asthma*. Curr Allergy Asthma Rep, 2013.
24. Wenzel, S., et al., *Dupilumab in persistent asthma with elevated eosinophil levels*. N Engl J Med, 2013. **368**(26): p. 2455-66.
25. Newcomb, D.C. and R. Stokes Peebles, Jr., *Th17-mediated inflammation in asthma*. Curr Opin Immunol, 2013.
26. Wechsler, M.E., et al., *Bronchial thermoplasty: Long-term safety and effectiveness in patients with severe persistent asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2013.
27. Wenzel, S.E., *Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches*. Nat Med, 2012. **18**(5): p. 716-25.
28. Lotvall, J., et al., *Asthma endotypes: a new approach to classification of disease entities within the asthma syndrome*. J Allergy Clin Immunol, 2011. **127**(2): p. 355-60.
29. Wenzel, S., *Severe asthma: from characteristics to phenotypes to endotypes*. Clin Exp Allergy, 2012. **42**(5): p. 650-8.
30. Benson, M.K., *Bronchial hyperreactivity*. Br J Dis Chest, 1975. **69**(0): p. 227-39.
31. Ross, R.M., *ATS/ACCP statement on cardiopulmonary exercise testing*. Am J Respir Crit Care Med, 2003. **167**(10): p. 1451; author reply 1451.
32. Ramsdale, E.H., et al., *Bronchial responsiveness to methacholine in chronic bronchitis: relationship to airflow obstruction and cold air responsiveness*. Thorax, 1984. **39**(12): p. 912-8.
33. Homer, R.J. and J.A. Elias, *Consequences of long-term inflammation. Airway remodeling*. Clin Chest Med, 2000. **21**(2): p. 331-43, ix.
34. Pfitzner, J., *Poiseuille and his law*. Anaesthesia, 1976. **31**(2): p. 273-5.
35. Bates, J.H., *Stochastic model of the pulmonary airway tree and its implications for bronchial responsiveness*. J Appl Physiol, 1993. **75**(6): p. 2493-9.
36. Cockcroft, D.W., et al., *Allergen-induced increase in non-allergic bronchial reactivity*. Clin Allergy, 1977. **7**(6): p. 503-13.
37. McCarthy, D.S. and J. Pepys, *Allergic broncho-pulmonary aspergillosis. Clinical immunology. 2. Skin, nasal and bronchial tests*. Clin Allergy, 1971. **1**(4): p. 415-32.
38. De Monchy, J.G., et al., *Bronchoalveolar eosinophilia during allergen-induced late asthmatic reactions*. Am Rev Respir Dis, 1985. **131**(3): p. 373-6.
39. Pin, I., et al., *Changes in the cellular profile of induced sputum after allergen-induced asthmatic responses*. Am Rev Respir Dis, 1992. **145**(6): p. 1265-9.
40. Gauvreau, G.M., et al., *Effect of low-dose ciclesonide on allergen-induced responses in subjects with mild allergic asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2005. **116**(2): p. 285-91.
41. Gauvreau, G.M., et al., *The effects of an anti-CD11a mAb, efalizumab, on allergen-induced airway responses and airway inflammation in subjects with atopic asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2003. **112**(2): p. 331-8.
42. Borish, L.C., et al., *Efficacy of soluble IL-4 receptor for the treatment of adults with asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2001. **107**(6): p. 963-70.
43. Tattersfield, A.E., et al., *Asthma*. Lancet, 2002. **360**(9342): p. 1313-22.

44. Hammad, H. and B.N. Lambrecht, *Recent progress in the biology of airway dendritic cells and implications for understanding the regulation of asthmatic inflammation*. J Allergy Clin Immunol, 2006. **118**(2): p. 331-6.
45. Ramos-Barbon, D., et al., *T Cells localize with proliferating smooth muscle alpha-actin+ cell compartments in asthma*. Am J Respir Crit Care Med, 2010. **182**(3): p. 317-24.
46. Begueret, H., et al., *Inflammation of bronchial smooth muscle in allergic asthma*. Thorax, 2007. **62**(1): p. 8-15.
47. Lazaar, A.L., et al., *T lymphocytes adhere to airway smooth muscle cells via integrins and CD44 and induce smooth muscle cell DNA synthesis*. J Exp Med, 1994. **180**(3): p. 807-16.
48. Mosmann, T.R., et al., *Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins*. J Immunol, 1986. **136**(7): p. 2348-57.
49. Romagnani, S., *Human TH1 and TH2 subsets: regulation of differentiation and role in protection and immunopathology*. Int Arch Allergy Immunol, 1992. **98**(4): p. 279-85.
50. Kim, C.H., et al., *Rules of chemokine receptor association with T cell polarization in vivo*. J Clin Invest, 2001. **108**(9): p. 1331-9.
51. Shirakawa, T., et al., *The inverse association between tuberculin responses and atopic disorder*. Science, 1997. **275**(5296): p. 77-9.
52. Oro, A.S., et al., *Regulation of disease susceptibility: decreased prevalence of IgE-mediated allergic disease in patients with multiple sclerosis*. J Allergy Clin Immunol, 1996. **97**(6): p. 1402-8.
53. Tang, L., et al., *Reduced prevalence of allergic disease in patients with multiple sclerosis is associated with enhanced IL-12 production*. J Allergy Clin Immunol, 1998. **102**(3): p. 428-35.
54. El Biaze, M., et al., *T cell activation, from atopy to asthma: more a paradox than a paradigm*. Allergy, 2003. **58**(9): p. 844-53.
55. Magnan, A.O., et al., *Assessment of the Th1/Th2 paradigm in whole blood in atopy and asthma. Increased IFN-gamma-producing CD8(+) T cells in asthma*. Am J Respir Crit Care Med, 2000. **161**(6): p. 1790-6.
56. Boniface, S., et al., *Assessment of T lymphocyte cytokine production in induced sputum from asthmatics: a flow cytometry study*. Clin Exp Allergy, 2003. **33**(9): p. 1238-43.
57. Licona-Limon, P., et al., *TH2, allergy and group 2 innate lymphoid cells*. Nat Immunol, 2013. **14**(6): p. 536-42.
58. Barlow, J.L., et al., *IL-33 is more potent than IL-25 in provoking IL-13-producing nuocytes (type 2 innate lymphoid cells) and airway contraction*. J Allergy Clin Immunol, 2013.
59. Seroogy, C.M. and J.E. Gern, *The role of T regulatory cells in asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2005. **116**(5): p. 996-9.
60. Akbari, O., et al., *CD4+ invariant T-cell-receptor+ natural killer T cells in bronchial asthma*. N Engl J Med, 2006. **354**(11): p. 1117-29.
61. Vijayanand, P., et al., *Invariant natural killer T cells in asthma and chronic obstructive pulmonary disease*. N Engl J Med, 2007. **356**(14): p. 1410-22.
62. Ling, E.M., et al., *Relation of CD4+CD25+ regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease*. Lancet, 2004. **363**(9409): p. 608-15.
63. Provoost, S., et al., *Decreased FOXP3 protein expression in patients with asthma*. Allergy, 2009. **64**(10): p. 1539-46.

64. Hartl, D., et al., *Quantitative and functional impairment of pulmonary CD4⁺CD25^{hi} regulatory T cells in pediatric asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2007. **119**(5): p. 1258-66.
65. Karagiannidis, C., et al., *Glucocorticoids upregulate FOXP3 expression and regulatory T cells in asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2004. **114**(6): p. 1425-33.
66. Huang, X., J. Zhu, and Y. Yang, *Protection against autoimmunity in nonlymphopenic hosts by CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells is antigen-specific and requires IL-10 and TGF-beta*. J Immunol, 2005. **175**(7): p. 4283-91.
67. Alcorn, J.F., C.R. Crowe, and J.K. Kolls, *TH17 cells in asthma and COPD*. Annu Rev Physiol, 2010. **72**: p. 495-516.
68. Iwakura, Y., et al., *The roles of IL-17A in inflammatory immune responses and host defense against pathogens*. Immunol Rev, 2008. **226**: p. 57-79.
69. Oboki, K., et al., *Th17 and allergy*. Allergol Int, 2008. **57**(2): p. 121-34.
70. Govindaraju, V., et al., *Interleukin-8: novel roles in human airway smooth muscle cell contraction and migration*. Am J Physiol Cell Physiol, 2006. **291**(5): p. C957-65.
71. Chang, Y., et al., *TH17 cytokines induce human airway smooth muscle cell migration*. J Allergy Clin Immunol, 2011. **127**(4): p. 1046-53 e1-2.
72. Chang, Y., et al., *Th17-associated cytokines promote human airway smooth muscle cell proliferation*. Faseb J, 2012. **26**(12): p. 5152-60.
73. Berger, P., P.O. Girodet, and J. Manuel Tunon-de-Lara, *Mast cell myositis: a new feature of allergic asthma?* Allergy, 2005. **60**(10): p. 1238-40.
74. Brightling, C.E., et al., *Differential expression of CCR3 and CXCR3 by human lung and bone marrow-derived mast cells: implications for tissue mast cell migration*. J Leukoc Biol, 2005. **77**(5): p. 759-66.
75. Brightling, C.E., et al., *The CXCL10/CXCR3 axis mediates human lung mast cell migration to asthmatic airway smooth muscle*. Am J Respir Crit Care Med, 2005. **171**(10): p. 1103-8.
76. El-Shazly, A., et al., *Fractalkine produced by airway smooth muscle cells contributes to mast cell recruitment in asthma*. J Immunol, 2006. **176**(3): p. 1860-8.
77. Berger, P., et al., *Tryptase-stimulated human airway smooth muscle cells induce cytokine synthesis and mast cell chemotaxis*. Faseb J, 2003. **17**(14): p. 2139-41.
78. Carroll, N.G., S. Mutavdzic, and A.L. James, *Increased mast cells and neutrophils in submucosal mucous glands and mucus plugging in patients with asthma*. Thorax, 2002. **57**(8): p. 677-82.
79. Okumura, S., et al., *FcepsilonRI-mediated amphiregulin production by human mast cells increases mucin gene expression in epithelial cells*. J Allergy Clin Immunol, 2005. **115**(2): p. 272-9.
80. Irani, A.A., et al., *Two types of human mast cells that have distinct neutral protease compositions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(12): p. 4464-8.
81. Balzar, S., et al., *Mast cell phenotype, location, and activation in severe asthma. Data from the Severe Asthma Research Program*. Am J Respir Crit Care Med, 2010. **183**(3): p. 299-309.
82. Glenner, G.G. and L.A. Cohen, *Histochemical demonstration of a species-specific trypsin-like enzyme in mast cells*. Nature, 1960. **185**: p. 846-7.
83. Wenzel, S.E., A.A. Fowler, 3rd, and L.B. Schwartz, *Activation of pulmonary mast cells by bronchoalveolar allergen challenge. In vivo release of histamine and tryptase in atopic subjects with and without asthma*. Am Rev Respir Dis, 1988. **137**(5): p. 1002-8.
84. Sekizawa, K., et al., *Mast cell tryptase causes airway smooth muscle hyperresponsiveness in dogs*. J Clin Invest, 1989. **83**(1): p. 175-9.

85. Berger, P., et al., *Mast cell tryptase as a mediator of hyperresponsiveness in human isolated bronchi*. Clin Exp Allergy, 1999. **29**(6): p. 804-12.
86. Berger, P., et al., *Selected contribution: tryptase-induced PAR-2-mediated Ca(2+) signaling in human airway smooth muscle cells*. J Appl Physiol, 2001. **91**(2): p. 995-1003.
87. Tam, E.K. and G.H. Caughey, *Degradation of airway neuropeptides by human lung tryptase*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1990. **3**(1): p. 27-32.
88. Molinari, J.F., et al., *Inhaled tryptase causes bronchoconstriction in sheep via histamine release*. Am J Respir Crit Care Med, 1996. **154**(3 Pt 1): p. 649-53.
89. Clark, J.M., et al., *Tryptase inhibitors block allergen-induced airway and inflammatory responses in allergic sheep*. Am J Respir Crit Care Med, 1995. **152**(6 Pt 1): p. 2076-83.
90. He, S. and A.F. Walls, *Human mast cell tryptase: a stimulus of microvascular leakage and mast cell activation*. Eur J Pharmacol, 1997. **328**(1): p. 89-97.
91. Cairns, J.A. and A.F. Walls, *Mast cell tryptase is a mitogen for epithelial cells. Stimulation of IL-8 production and intercellular adhesion molecule-1 expression*. J Immunol, 1996. **156**(1): p. 275-83.
92. Compton, S.J., et al., *The role of mast cell tryptase in regulating endothelial cell proliferation, cytokine release, and adhesion molecule expression: tryptase induces expression of mRNA for IL-1 beta and IL-8 and stimulates the selective release of IL-8 from human umbilical vein endothelial cells*. J Immunol, 1998. **161**(4): p. 1939-46.
93. Berger, P., et al., *Tryptase and agonists of PAR-2 induce the proliferation of human airway smooth muscle cells*. J Appl Physiol, 2001. **91**(3): p. 1372-9.
94. Akers, I.A., et al., *Mast cell tryptase stimulates human lung fibroblast proliferation via protease-activated receptor-2*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2000. **278**(1): p. L193-201.
95. Gruber, B.L., et al., *Human mast cells activate fibroblasts: tryptase is a fibrogenic factor stimulating collagen messenger ribonucleic acid synthesis and fibroblast chemotaxis*. J Immunol, 1997. **158**(5): p. 2310-7.
96. Bousquet, J., et al., *Eosinophilic inflammation in asthma*. N Engl J Med, 1990. **323**(15): p. 1033-9.
97. Pang, L., et al., *Mast cell beta-tryptase selectively cleaves eotaxin and RANTES and abrogates their eosinophil chemotactic activities*. J Immunol, 2006. **176**(6): p. 3788-95.
98. Enokihara, H., et al., *Eosinophils negatively regulate eosinophilopoiesis by decreasing IL-5 levels*. Int Arch Allergy Immunol, 1996. **111 Suppl 1**: p. 2-4.
99. Tomaki, M., et al., *Eosinophilopoiesis in a murine model of allergic airway eosinophilia: involvement of bone marrow IL-5 and IL-5 receptor alpha*. J Immunol, 2000. **165**(7): p. 4040-50.
100. Martin, L.B., et al., *Eosinophils in allergy: role in disease, degranulation, and cytokines*. Int Arch Allergy Immunol, 1996. **109**(3): p. 207-15.
101. Takafuji, S., et al., *Eosinophil degranulation in the presence of bronchial epithelial cells. Effect of cytokines and role of adhesion*. J Immunol, 1996. **156**(10): p. 3980-5.
102. Jatakanon, A., et al., *Neutrophilic inflammation in severe persistent asthma*. Am J Respir Crit Care Med, 1999. **160**(5 Pt 1): p. 1532-9.
103. Sur, S., et al., *Sudden-onset fatal asthma. A distinct entity with few eosinophils and relatively more neutrophils in the airway submucosa?* Am Rev Respir Dis, 1993. **148**(3): p. 713-9.

104. Silvestri, M., et al., *High serum levels of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-8 in severe asthma: markers of systemic inflammation?* Clin Exp Allergy, 2006. **36**(11): p. 1373-81.
105. Shaw, D.E., et al., *Association between neutrophilic airway inflammation and airflow limitation in adults with asthma.* Chest, 2007. **132**(6): p. 1871-5.
106. Cowan, D.C., et al., *Effects of steroid therapy on inflammatory cell subtypes in asthma.* Thorax, 2010. **65**(5): p. 384-90.
107. Contoli, M., et al., *Fixed airflow obstruction due to asthma or chronic obstructive pulmonary disease: 5-year follow-up.* J Allergy Clin Immunol, 2010. **125**(4): p. 830-7.
108. Gupta, S., et al., *Quantitative analysis of high-resolution computed tomography scans in severe asthma subphenotypes.* Thorax, 2010. **65**(9): p. 775-81.
109. Wenzel, S.E., et al., *Bronchoscopic evaluation of severe asthma. Persistent inflammation associated with high dose glucocorticoids.* Am J Respir Crit Care Med, 1997. **156**(3 Pt 1): p. 737-43.
110. Jarjour, N.N., et al., *The effect of an experimental rhinovirus 16 infection on bronchial lavage neutrophils.* J Allergy Clin Immunol, 2000. **105**(6 Pt 1): p. 1169-77.
111. Wenzel, S.E., et al., *Evidence that severe asthma can be divided pathologically into two inflammatory subtypes with distinct physiologic and clinical characteristics.* Am J Respir Crit Care Med, 1999. **160**(3): p. 1001-8.
112. Qiu, Y., et al., *Bronchial mucosal inflammation and upregulation of CXC chemoattractants and receptors in severe exacerbations of asthma.* Thorax, 2007. **62**(6): p. 475-82.
113. Baraldo, S., et al., *Neutrophilic infiltration within the airway smooth muscle in patients with COPD.* Thorax, 2004. **59**(4): p. 308-12.
114. Silva, P.L., et al., *Impact of lung remodelling on respiratory mechanics in a model of severe allergic inflammation.* Respir Physiol Neurobiol, 2008. **160**(3): p. 239-48.
115. Nagaoka, I., et al., *Evaluation of the expression of human CAP18 gene during neutrophil maturation in the bone marrow.* J Leukoc Biol, 1998. **64**(6): p. 845-52.
116. Ordonez, C.L., et al., *Increased neutrophil numbers and IL-8 levels in airway secretions in acute severe asthma: Clinical and biologic significance.* Am J Respir Crit Care Med, 2000. **161**(4 Pt 1): p. 1185-90.
117. White, J.R., et al., *Identification of a potent, selective non-peptide CXCR2 antagonist that inhibits interleukin-8-induced neutrophil migration.* J Biol Chem, 1998. **273**(17): p. 10095-8.
118. Devi, S., et al., *Neutrophil mobilization via plerixafor-mediated CXCR4 inhibition arises from lung demargination and blockade of neutrophil homing to the bone marrow.* J Exp Med, 2013.
119. Dworski, R., et al., *Eosinophil and neutrophil extracellular DNA traps in human allergic asthmatic airways.* J Allergy Clin Immunol, 2011. **127**(5): p. 1260-6.
120. De, S., et al., *IL-1 beta and IL-6 induce hyperplasia and hypertrophy of cultured guinea pig airway smooth muscle cells.* J Appl Physiol, 1995. **78**(4): p. 1555-63.
121. Thomas, P.S., D.H. Yates, and P.J. Barnes, *Tumor necrosis factor-alpha increases airway responsiveness and sputum neutrophilia in normal human subjects.* Am J Respir Crit Care Med, 1995. **152**(1): p. 76-80.
122. Chu, H.W., et al., *Peripheral blood and airway tissue expression of transforming growth factor beta by neutrophils in asthmatic subjects and normal control subjects.* J Allergy Clin Immunol, 2000. **106**(6): p. 1115-23.
123. Gadek, J.E., et al., *Human neutrophil elastase functions as a type III collagen "collagenase".* Biochem Biophys Res Commun, 1980. **95**(4): p. 1815-22.

124. Huang, C.D., et al., *Human neutrophil-derived elastase induces airway smooth muscle cell proliferation*. Life Sci, 2004. **74**(20): p. 2479-92.
125. Oltmanns, U., et al., *Induction of human airway smooth muscle apoptosis by neutrophils and neutrophil elastase*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2005. **32**(4): p. 334-41.
126. Lee, K.Y., et al., *Neutrophil-derived elastase induces TGF-beta1 secretion in human airway smooth muscle via NF-kappaB pathway*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2006. **35**(4): p. 407-14.
127. Ho, S.C., et al., *Neutrophil elastase represses IL-8/CXCL8 synthesis in human airway smooth muscle cells through induction of NF-kappa B repressing factor*. J Immunol, 2009. **183**(1): p. 411-20.
128. Tang, H., et al., *YKL-40 induces IL-8 expression from bronchial epithelium via MAPK (JNK and ERK) and NF-kappaB pathways, causing bronchial smooth muscle proliferation and migration*. J Immunol, 2013. **190**(1): p. 438-46.
129. Ramachandran, R., et al., *Neutrophil elastase acts as a biased agonist for proteinase-activated receptor-2 (PAR2)*. J Biol Chem, 2011. **286**(28): p. 24638-48.
130. Volck, B., et al., *YKL-40, a mammalian member of the chitinase family, is a matrix protein of specific granules in human neutrophils*. Proc Assoc Am Physicians, 1998. **110**(4): p. 351-60.
131. Bara, I., et al., *Role of YKL-40 in bronchial smooth muscle remodeling in asthma*. Am J Respir Crit Care Med, 2012. **185**(7): p. 715-22.
132. Konradsen, J.R., et al., *The chitinase-like protein YKL-40: A possible biomarker of inflammation and airway remodeling in severe pediatric asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2013. **132**(2): p. 328-335 e5.
133. Otsuka, K., et al., *Sputum YKL-40 levels and pathophysiology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease*. Respiration, 2012. **83**(6): p. 507-19.
134. Bergeron, C., W. Al-Ramli, and Q. Hamid, *Remodeling in asthma*. Proc Am Thorac Soc, 2009. **6**(3): p. 301-5.
135. Payne, D.N., et al., *Early thickening of the reticular basement membrane in children with difficult asthma*. Am J Respir Crit Care Med, 2003. **167**(1): p. 78-82.
136. Barbato, A., et al., *Epithelial damage and angiogenesis in the airways of children with asthma*. Am J Respir Crit Care Med, 2006. **174**(9): p. 975-81.
137. Pepe, C., et al., *Differences in airway remodeling between subjects with severe and moderate asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2005. **116**(3): p. 544-9.
138. Jeffery, P.K., et al., *Bronchial biopsies in asthma. An ultrastructural, quantitative study and correlation with hyperreactivity*. Am Rev Respir Dis, 1989. **140**(6): p. 1745-53.
139. Chanez, P., *Severe asthma is an epithelial disease*. Eur Respir J, 2005. **25**(6): p. 945-6.
140. Benayoun, L., et al., *Airway structural alterations selectively associated with severe asthma*. Am J Respir Crit Care Med, 2003. **167**(10): p. 1360-8.
141. Vermeer, P.D., et al., *Interleukin-9 induces goblet cell hyperplasia during repair of human airway epithelia*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2003. **28**(3): p. 286-95.
142. Bruno, A., et al., *Leptin and leptin receptor expression in asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2009. **124**(2): p. 230-7, 237 e1-4.
143. Vachier, I., et al., *Severe asthma is associated with a loss of LX4, an endogenous anti-inflammatory compound*. J Allergy Clin Immunol, 2005. **115**(1): p. 55-60.
144. Tam, A., et al., *The airway epithelium: more than just a structural barrier*. Ther Adv Respir Dis, 2011. **5**(4): p. 255-73.
145. Huang, J., et al., *Enhanced proteoglycan deposition in the airway wall of atopic asthmatics*. Am J Respir Crit Care Med, 1999. **160**(2): p. 725-9.

146. Laitinen, A., et al., *Tenascin is increased in airway basement membrane of asthmatics and decreased by an inhaled steroid*. Am J Respir Crit Care Med, 1997. **156**(3 Pt 1): p. 951-8.
147. Demedts, I.K., et al., *Matrix metalloproteinases in asthma and COPD*. Curr Opin Pharmacol, 2005. **5**(3): p. 257-63.
148. Wenzel, S.E., et al., *Subepithelial basement membrane immunoreactivity for matrix metalloproteinase 9: association with asthma severity, neutrophilic inflammation, and wound repair*. J Allergy Clin Immunol, 2003. **111**(6): p. 1345-52.
149. Rogers, D.F., *Airway mucus hypersecretion in asthma: an undervalued pathology?* Curr Opin Pharmacol, 2004. **4**(3): p. 241-50.
150. Ordonez, C.L., et al., *Mild and moderate asthma is associated with airway goblet cell hyperplasia and abnormalities in mucin gene expression*. Am J Respir Crit Care Med, 2001. **163**(2): p. 517-23.
151. Evans, C.M. and J.S. Koo, *Airway mucus: the good, the bad, the sticky*. Pharmacol Ther, 2009. **121**(3): p. 332-48.
152. Dabbagh, K., et al., *IL-4 induces mucin gene expression and goblet cell metaplasia in vitro and in vivo*. J Immunol, 1999. **162**(10): p. 6233-7.
153. Louahed, J., et al., *Interleukin-9 upregulates mucus expression in the airways*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2000. **22**(6): p. 649-56.
154. Busse, P.J., et al., *Chronic exposure to TNF-alpha increases airway mucus gene expression in vivo*. J Allergy Clin Immunol, 2005. **116**(6): p. 1256-63.
155. Chen, Y., et al., *Stimulation of airway mucin gene expression by interleukin (IL)-17 through IL-6 paracrine/autocrine loop*. J Biol Chem, 2003. **278**(19): p. 17036-43.
156. Vrugt, B., et al., *Bronchial angiogenesis in severe glucocorticoid-dependent asthma*. Eur Respir J, 2000. **15**(6): p. 1014-21.
157. Hashimoto, M., H. Tanaka, and S. Abe, *Quantitative analysis of bronchial wall vascularity in the medium and small airways of patients with asthma and COPD*. Chest, 2005. **127**(3): p. 965-72.
158. Detoraki, A., et al., *Angiogenesis and lymphangiogenesis in bronchial asthma*. Allergy, 2010. **65**(8): p. 946-58.
159. Hoshino, M., M. Takahashi, and N. Aoike, *Expression of vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor, and angiogenin immunoreactivity in asthmatic airways and its relationship to angiogenesis*. J Allergy Clin Immunol, 2001. **107**(2): p. 295-301.
160. Hoshino, M., Y. Nakamura, and Q.A. Hamid, *Gene expression of vascular endothelial growth factor and its receptors and angiogenesis in bronchial asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2001. **107**(6): p. 1034-8.
161. Lee, Y.C., Y.G. Kwak, and C.H. Song, *Contribution of vascular endothelial growth factor to airway hyperresponsiveness and inflammation in a murine model of toluene diisocyanate-induced asthma*. J Immunol, 2002. **168**(7): p. 3595-600.
162. Lee, C.G., et al., *Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces remodeling and enhances TH2-mediated sensitization and inflammation in the lung*. Nat Med, 2004. **10**(10): p. 1095-103.
163. Gregory, L.G., et al., *IL-25 drives remodelling in allergic airways disease induced by house dust mite*. Thorax, 2013. **68**(1): p. 82-90.
164. Byrne, A.J., et al., *Lung macrophages contribute to house dust mite driven airway remodeling via HIF-1alpha*. PLoS One, 2013. **8**(7): p. e69246.
165. Ebina, M., et al., *Cellular hypertrophy and hyperplasia of airway smooth muscles underlying bronchial asthma. A 3-D morphometric study*. Am Rev Respir Dis, 1993. **148**(3): p. 720-6.

166. Bara, I., et al., *Pathophysiology of bronchial smooth muscle remodelling in asthma*. Eur Respir J, 2010. **36**(5): p. 1174-84.
167. Lan, R.S., G.A. Stewart, and P.J. Henry, *Role of protease-activated receptors in airway function: a target for therapeutic intervention?* Pharmacol Ther, 2002. **95**(3): p. 239-57.
168. Macfarlane, S.R., et al., *Proteinase-activated receptors*. Pharmacol Rev, 2001. **53**(2): p. 245-82.
169. O'Brien, P.J., et al., *Protease activated receptors: theme and variations*. Oncogene, 2001. **20**(13): p. 1570-81.
170. Reed, C.E. and H. Kita, *The role of protease activation of inflammation in allergic respiratory diseases*. J Allergy Clin Immunol, 2004. **114**(5): p. 997-1008; quiz 1009.
171. Cocks, T.M. and J.D. Moffatt, *Protease-activated receptor-2 (PAR2) in the airways*. Pulm Pharmacol Ther, 2001. **14**(3): p. 183-91.
172. Rothmeier, A.S. and W. Ruf, *Protease-activated receptor 2 signaling in inflammation*. Semin Immunopathol, 2012. **34**(1): p. 133-49.
173. Ossovskaya, V.S. and N.W. Bunnett, *Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease*. Physiol Rev, 2004. **84**(2): p. 579-621.
174. Henry, P.J., *The protease-activated receptor2 (PAR2)-prostaglandin E2-prostanoid EP receptor axis: a potential bronchoprotective unit in the respiratory tract?* Eur J Pharmacol, 2006. **533**(1-3): p. 156-70.
175. Steinhoff, M., et al., *Proteinase-activated receptors: transducers of proteinase-mediated signaling in inflammation and immune response*. Endocr Rev, 2005. **26**(1): p. 1-43.
176. Knight, D.A., et al., *Protease-activated receptors in human airways: upregulation of PAR-2 in respiratory epithelium from patients with asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2001. **108**(5): p. 797-803.
177. Yoshida, T., et al., *The expression of protease-activated receptors in chronic rhinosinusitis*. Int Arch Allergy Immunol, 2013. **161 Suppl 2**: p. 138-46.
178. Cicala, C., et al., *Bronchoconstrictor effect of thrombin and thrombin receptor activating peptide in guinea-pigs in vivo*. Br J Pharmacol, 1999. **126**(2): p. 478-84.
179. Lan, R.S., et al., *Altered expression and in vivo lung function of protease-activated receptors during influenza A virus infection in mice*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2004. **286**(2): p. L388-98.
180. Cocks, T.M., et al., *A protective role for protease-activated receptors in the airways*. Nature, 1999. **398**(6723): p. 156-60.
181. Chow, J.M., J.D. Moffatt, and T.M. Cocks, *Effect of protease-activated receptor (PAR)-1, -2 and -4-activating peptides, thrombin and trypsin in rat isolated airways*. Br J Pharmacol, 2000. **131**(8): p. 1584-91.
182. Lan, R.S., G.A. Stewart, and P.J. Henry, *Modulation of airway smooth muscle tone by protease activated receptor-1,-2,-3 and -4 in trachea isolated from influenza A virus-infected mice*. Br J Pharmacol, 2000. **129**(1): p. 63-70.
183. Lan, R.S., et al., *Role of PGE(2) in protease-activated receptor-1, -2 and -4 mediated relaxation in the mouse isolated trachea*. Br J Pharmacol, 2001. **132**(1): p. 93-100.
184. Saleh, S.M., et al., *Influence of dexamethasone on protease-activated receptor 2-mediated responses in the airways*. J Pharmacol Exp Ther, 2008. **324**(2): p. 622-30.
185. Saifedine, M., et al., *Contractile actions of proteinase-activated receptor-derived polypeptides in guinea-pig gastric and lung parenchymal strips: evidence for distinct receptor systems*. Br J Pharmacol, 2001. **132**(2): p. 556-66.

186. Hauck, R.W., et al., *alpha-Thrombin stimulates contraction of human bronchial rings by activation of protease-activated receptors*. Am J Physiol, 1999. **277**(1 Pt 1): p. L22-9.
187. Jenkins, A.L., et al., *Expression of protease-activated receptor-2 during embryonic development*. Dev Dyn, 2000. **218**(3): p. 465-71.
188. D'Andrea, M.R., et al., *Characterization of protease-activated receptor-2 immunoreactivity in normal human tissues*. J Histochem Cytochem, 1998. **46**(2): p. 157-64.
189. Schmidlin, F., et al., *Expression and function of proteinase-activated receptor 2 in human bronchial smooth muscle*. Am J Respir Crit Care Med, 2001. **164**(7): p. 1276-81.
190. Miotto, D., et al., *Expression of protease activated receptor-2 (PAR-2) in central airways of smokers and non-smokers*. Thorax, 2002. **57**(2): p. 146-51.
191. Asokanathan, N., et al., *Activation of protease-activated receptor (PAR)-1, PAR-2, and PAR-4 stimulates IL-6, IL-8, and prostaglandin E2 release from human respiratory epithelial cells*. J Immunol, 2002. **168**(7): p. 3577-85.
192. Ricciardolo, F.L., et al., *Presence and bronchomotor activity of protease-activated receptor-2 in guinea pig airways*. Am J Respir Crit Care Med, 2000. **161**(5): p. 1672-80.
193. Cicala, C., et al., *Protective effect of a PAR2-activating peptide on histamine-induced bronchoconstriction in guinea-pig*. Br J Pharmacol, 2001. **132**(6): p. 1229-34.
194. D'Agostino, B., et al., *Activation of protease-activated receptor-2 reduces airways inflammation in experimental allergic asthma*. Clin Exp Allergy, 2007. **37**(10): p. 1436-43.
195. Boitano, S., et al., *Alternaria alternata serine proteases induce lung inflammation and airway epithelial cell activation via PAR2*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2011. **300**(4): p. L605-14.
196. De Campo, B.A. and P.J. Henry, *Stimulation of protease-activated receptor-2 inhibits airway eosinophilia, hyperresponsiveness and bronchoconstriction in a murine model of allergic inflammation*. Br J Pharmacol, 2005. **144**(8): p. 1100-8.
197. Chambers, L.S., et al., *Functional effects of protease-activated receptor-2 stimulation on human airway smooth muscle*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2001. **281**(6): p. L1369-78.
198. Kawabata, A., et al., *Proteinase-activated receptor-2-mediated relaxation in mouse tracheal and bronchial smooth muscle: signal transduction mechanisms and distinct agonist sensitivity*. J Pharmacol Exp Ther, 2004. **311**(1): p. 402-10.
199. Morello, S., et al., *A protective role for proteinase activated receptor 2 in airways of lipopolysaccharide-treated rats*. Biochem Pharmacol, 2005. **71**(1-2): p. 223-30.
200. Lee, H.J., et al., *Protease-activated receptor 2 mediates mucus secretion in the airway submucosal gland*. PLoS One, 2012. **7**(8): p. e43188.
201. Cho, H.J., et al., *Protease-activated receptor 2-dependent fluid secretion from airway submucosal glands by house dust mite extract*. J Allergy Clin Immunol, 2012. **129**(2): p. 529-35, 535 e1-5.
202. Shimizu, S., et al., *Thrombin stimulates the expression of PDGF in lung epithelial cells*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2000. **279**(3): p. L503-10.
203. Zhou, J., et al., *Neutrophil elastase induces MUC5AC secretion via protease-activated receptor 2*. Mol Cell Biochem, 2013. **377**(1-2): p. 75-85.
204. Asokanathan, N., et al., *House dust mite allergens induce proinflammatory cytokines from respiratory epithelial cells: the cysteine protease allergen, Der p 1, activates*

- protease-activated receptor (PAR)-2 and inactivates PAR-1. J Immunol, 2002. 169(8): p. 4572-8.*
205. Oshiro, A., et al., *Protease-activated receptor-2-mediated Ca²⁺ signaling in guinea pig tracheal epithelial cells. Life Sci, 2002. 71(5): p. 547-58.*
 206. Ubl, J.J., et al., *Human bronchial epithelial cells express PAR-2 with different sensitivity to thermolysin. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2002. 282(6): p. L1339-48.*
 207. Miki, M., et al., *Effect of human airway trypsin-like protease on intracellular free Ca²⁺ concentration in human bronchial epithelial cells. J Med Invest, 2003. 50(1-2): p. 95-107.*
 208. Hong, J.H., et al., *German cockroach extract activates protease-activated receptor 2 in human airway epithelial cells. J Allergy Clin Immunol, 2004. 113(2): p. 315-9.*
 209. O'Grady, S.M., et al., *ATP release and Ca²⁺ signaling by human bronchial epithelial cells following Alternaria aeroallergen exposure. J Physiol, 2013.*
 210. Sun, G., et al., *Interaction of mite allergens Der p3 and Der p9 with protease-activated receptor-2 expressed by lung epithelial cells. J Immunol, 2001. 167(2): p. 1014-21.*
 211. Matsuwaki, Y., et al., *Alternaria fungus induces the production of GM-CSF, interleukin-6 and interleukin-8 and calcium signaling in human airway epithelium through protease-activated receptor 2. Int Arch Allergy Immunol, 2012. 158 Suppl 1: p. 19-29.*
 212. Kunzelmann, K., et al., *Control of ion transport in mammalian airways by protease activated receptors type 2 (PAR-2). Faseb J, 2005. 19(8): p. 969-70.*
 213. Danahay, H., et al., *Protease-activated receptor-2-mediated inhibition of ion transport in human bronchial epithelial cells. Am J Physiol Cell Physiol, 2001. 280(6): p. C1455-64.*
 214. Vliagoftis, H., et al., *Proteinase-activated receptor-2-mediated matrix metalloproteinase-9 release from airway epithelial cells. J Allergy Clin Immunol, 2000. 106(3): p. 537-45.*
 215. Vliagoftis, H., et al., *Airway epithelial cells release eosinophil survival-promoting factors (GM-CSF) after stimulation of proteinase-activated receptor 2. J Allergy Clin Immunol, 2001. 107(4): p. 679-85.*
 216. Kouzaki, H., et al., *Proteases induce production of thymic stromal lymphopoietin by airway epithelial cells through protease-activated receptor-2. J Immunol, 2009. 183(2): p. 1427-34.*
 217. Kauffman, H.F., et al., *Protease-dependent activation of epithelial cells by fungal allergens leads to morphologic changes and cytokine production. J Allergy Clin Immunol, 2000. 105(6 Pt 1): p. 1185-93.*
 218. Page, K., V.S. Strunk, and M.B. Hershenon, *Cockroach proteases increase IL-8 expression in human bronchial epithelial cells via activation of protease-activated receptor (PAR)-2 and extracellular-signal-regulated kinase. J Allergy Clin Immunol, 2003. 112(6): p. 1112-8.*
 219. Page, K., et al., *German cockroach proteases regulate interleukin-8 expression via nuclear factor for interleukin-6 in human bronchial epithelial cells. Am J Respir Cell Mol Biol, 2005. 32(3): p. 225-31.*
 220. Dulon, S., et al., *Proteinase-activated receptor-2 and human lung epithelial cells: disarming by neutrophil serine proteinases. Am J Respir Cell Mol Biol, 2003. 28(3): p. 339-46.*

221. Dulon, S., et al., *Pseudomonas aeruginosa elastase disables proteinase-activated receptor 2 in respiratory epithelial cells*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2005. **32**(5): p. 411-9.
222. Lin, K.W., et al., *Protease-activated receptor-2 (PAR-2) is a weak enhancer of mucin secretion by human bronchial epithelial cells in vitro*. Int J Biochem Cell Biol, 2008. **40**(6-7): p. 1379-88.
223. Chokki, M., et al., *Human airway trypsin-like protease increases mucin gene expression in airway epithelial cells*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2004. **30**(4): p. 470-8.
224. Walker, T.R., et al., *Thrombin induces DNA synthesis and phosphoinositide hydrolysis in airway smooth muscle by activation of distinct receptors*. Biochem Pharmacol, 2005. **70**(6): p. 959-67.
225. Walker, T.R., et al., *Platelet-derived growth factor-BB and thrombin activate phosphoinositide 3-kinase and protein kinase B: role in mediating airway smooth muscle proliferation*. Mol Pharmacol, 1998. **54**(6): p. 1007-15.
226. Krymskaya, V.P., et al., *Phosphatidylinositol 3-kinase mediates mitogen-induced human airway smooth muscle cell proliferation*. Am J Physiol, 1999. **277**(1 Pt 1): p. L65-78.
227. Tran, T. and A.G. Stewart, *Protease-activated receptor (PAR)-independent growth and pro-inflammatory actions of thrombin on human cultured airway smooth muscle*. Br J Pharmacol, 2003. **138**(5): p. 865-75.
228. Brown, J.K., et al., *Tryptase-induced mitogenesis in airway smooth muscle cells. Potency, mechanisms, and interactions with other mast cell mediators*. Chest, 1995. **107**(3 Suppl): p. 95S-96S.
229. Brown, J.K., et al., *Tryptase's potent mitogenic effects in human airway smooth muscle cells are via nonproteolytic actions*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2002. **282**(2): p. L197-206.
230. Chambers, L.S., et al., *PAR-2 activation, PGE2, and COX-2 in human asthmatic and nonasthmatic airway smooth muscle cells*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2003. **285**(3): p. L619-27.
231. Freund-Michel, V. and N. Frossard, *Inflammatory conditions increase expression of protease-activated receptor-2 by human airway smooth muscle cells in culture*. Fundam Clin Pharmacol, 2006. **20**(4): p. 351-7.
232. Chhabra, J., et al., *Histamine and tryptase modulate asthmatic airway smooth muscle GM-CSF and RANTES release*. Eur Respir J, 2007. **29**(5): p. 861-70.
233. Miglino, N., et al., *House dust mite extract downregulates C/EBPalpha in asthmatic bronchial smooth muscle cells*. Eur Respir J, 2011. **38**(1): p. 50-8.
234. Trejo, J., A.J. Connolly, and S.R. Coughlin, *The cloned thrombin receptor is necessary and sufficient for activation of mitogen-activated protein kinase and mitogenesis in mouse lung fibroblasts. Loss of responses in fibroblasts from receptor knockout mice*. J Biol Chem, 1996. **271**(35): p. 21536-41.
235. Chen, Y.H., et al., *Activation of Src family kinase activity by the G protein-coupled thrombin receptor in growth-responsive fibroblasts*. J Biol Chem, 1994. **269**(44): p. 27372-7.
236. Chambers, R.C., et al., *Thrombin stimulates fibroblast procollagen production via proteolytic activation of protease-activated receptor 1*. Biochem J, 1998. **333** (Pt 1): p. 121-7.
237. Chambers, R.C., et al., *Thrombin is a potent inducer of connective tissue growth factor production via proteolytic activation of protease-activated receptor-1*. J Biol Chem, 2000. **275**(45): p. 35584-91.

238. Ruoss, S.J., T. Hartmann, and G.H. Caughey, *Mast cell tryptase is a mitogen for cultured fibroblasts*. J Clin Invest, 1991. **88**(2): p. 493-9.
239. Matsushima, R., et al., *Human airway trypsin-like protease stimulates human bronchial fibroblast proliferation in a protease-activated receptor-2-dependent pathway*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2005. **290**(2): p. L385-95.
240. Siehler, S., *Regulation of RhoGEF proteins by G12/13-coupled receptors*. Br J Pharmacol, 2009. **158**(1): p. 41-9.
241. van Biesen, T., et al., *Mitogenic signaling via G protein-coupled receptors*. Endocr Rev, 1996. **17**(6): p. 698-714.
242. Brightling, C.E., et al., *Mast-cell infiltration of airway smooth muscle in asthma*. N Engl J Med, 2002. **346**(22): p. 1699-705.
243. Chupp, G.L., et al., *A chitinase-like protein in the lung and circulation of patients with severe asthma*. N Engl J Med, 2007. **357**(20): p. 2016-27.
244. Schmidlin, F., et al., *Protease-activated receptor 2 mediates eosinophil infiltration and hyperreactivity in allergic inflammation of the airway*. J Immunol, 2002. **169**(9): p. 5315-21.
245. Ebeling, C., et al., *Proteinase-activated receptor 2 activation in the airways enhances antigen-mediated airway inflammation and airway hyperresponsiveness through different pathways*. J Allergy Clin Immunol, 2005. **115**(3): p. 623-30.
246. Nichols, H.L., et al., *beta-Arrestin-2 mediates the proinflammatory effects of proteinase-activated receptor-2 in the airway*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(41): p. 16660-5.
247. Peters, T. and P.J. Henry, *Protease-activated receptors and prostaglandins in inflammatory lung disease*. Br J Pharmacol, 2009. **158**(4): p. 1017-33.
248. King, C., et al., *Dust mite proteolytic allergens induce cytokine release from cultured airway epithelium*. J Immunol, 1998. **161**(7): p. 3645-51.
249. Young, L., et al., *Detection of Mycoplasma in cell cultures*. Nat Protoc, 2010. **5**(5): p. 929-34.
250. Kelly, J.T. and W.W. Busse, *Host immune responses to rhinovirus: mechanisms in asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2008. **122**(4): p. 671-82; quiz 683-4.
251. Lau, S.K., et al., *Clinical features and complete genome characterization of a distinct human rhinovirus (HRV) genetic cluster, probably representing a previously undetected HRV species, HRV-C, associated with acute respiratory illness in children*. J Clin Microbiol, 2007. **45**(11): p. 3655-64.
252. Lee, W.M., et al., *A diverse group of previously unrecognized human rhinoviruses are common causes of respiratory illnesses in infants*. PLoS One, 2007. **2**(10): p. e966.
253. Trian, T., et al., *Bronchial smooth muscle remodeling involves calcium-dependent enhanced mitochondrial biogenesis in asthma*. J Exp Med, 2007. **204**(13): p. 3173-81.
254. Simeone-Penney, M.C., et al., *PDGF-induced human airway smooth muscle cell proliferation requires STAT3 and the small GTPase Rac1*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2008. **294**(4): p. L698-704.
255. Simmons, A., et al., *Use of recombinant lentivirus pseudotyped with vesicular stomatitis virus glycoprotein G for efficient generation of human anti-cancer chimeric T cells by transduction of human peripheral blood lymphocytes in vitro*. Virol J, 2006. **3**: p. 8.
256. Robbins, P.B., et al., *Increased probability of expression from modified retroviral vectors in embryonal stem cells and embryonal carcinoma cells*. J Virol, 1997. **71**(12): p. 9466-74.
257. Trian, T., et al., *RNA interference decreases PAR-2 expression and function in human airway smooth muscle cells*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2006. **34**(1): p. 49-55.

258. Johnson, P.R., et al., *Airway smooth muscle cell proliferation is increased in asthma*. Am J Respir Crit Care Med, 2001. **164**(3): p. 474-7.
259. Roth, M., et al., *Dysfunctional interaction of C/EBPalpha and the glucocorticoid receptor in asthmatic bronchial smooth-muscle cells*. N Engl J Med, 2004. **351**(6): p. 560-74.
260. Holgate, S.T., *The sentinel role of the airway epithelium in asthma pathogenesis*. Immunol Rev, 2011. **242**(1): p. 205-19.
261. Henderson, W.R., Jr., et al., *A role for cysteinyl leukotrienes in airway remodeling in a mouse asthma model*. Am J Respir Crit Care Med, 2002. **165**(1): p. 108-16.
262. Pang, L. and A.J. Knox, *Synergistic inhibition by beta(2)-agonists and corticosteroids on tumor necrosis factor-alpha-induced interleukin-8 release from cultured human airway smooth-muscle cells*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2000. **23**(1): p. 79-85.
263. Donninger, H., et al., *Rhinovirus induction of the CXC chemokine epithelial-neutrophil activating peptide-78 in bronchial epithelium*. J Infect Dis, 2003. **187**(11): p. 1809-17.
264. Shi, L., et al., *Rhinovirus-induced IL-1beta release from bronchial epithelial cells is independent of functional P2X7*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2012. **47**(3): p. 363-71.
265. Jarai, G., et al., *Effects of interleukin-1beta, interleukin-13 and transforming growth factor-beta on gene expression in human airway smooth muscle using gene microarrays*. Eur J Pharmacol, 2004. **497**(3): p. 255-65.
266. Hollak, C.E., et al., *Marked elevation of plasma chitotriosidase activity. A novel hallmark of Gaucher disease*. J Clin Invest, 1994. **93**(3): p. 1288-92.
267. Malaguarnera, L., *Chitotriosidase: the yin and yang*. Cell Mol Life Sci, 2006. **63**(24): p. 3018-29.
268. He, L.K., et al., *The expression of cyclooxygenase and the production of prostaglandin E2 in neutrophils after burn injury and infection*. J Burn Care Rehabil, 2001. **22**(1): p. 58-64.
269. Yan, H., et al., *Anti-mitogenic effects of beta-agonists and PGE2 on airway smooth muscle are PKA dependent*. Faseb J, 2011. **25**(1): p. 389-97.
270. Siddiqui, S., et al., *The modulation of large airway smooth muscle phenotype and effects of epidermal growth factor receptor inhibition in the repeatedly allergen-challenged rat*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2013. **304**(12): p. L853-62.
271. Kaur, D. and C. Brightling, *OX40/OX40 ligand interactions in T-cell regulation and asthma*. Chest, 2012. **141**(2): p. 494-9.
272. Kato, A., et al., *TLR3- and Th2 cytokine-dependent production of thymic stromal lymphopoietin in human airway epithelial cells*. J Immunol, 2007. **179**(2): p. 1080-7.
273. Wiehler, S. and D. Proud, *Interleukin-17A modulates human airway epithelial responses to human rhinovirus infection*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2007. **293**(2): p. L505-15.
274. Hudy, M.H. and D. Proud, *Cigarette smoke enhances human rhinovirus-induced CXCL8 production via HuR-mediated mRNA stabilization in human airway epithelial cells*. Respir Res, 2013. **14**(1): p. 88.
275. Edwards, M.R., M.W. Johnson, and S.L. Johnston, *Combination therapy: Synergistic suppression of virus-induced chemokines in airway epithelial cells*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2006. **34**(5): p. 616-24.
276. Chun, Y.H., et al., *Rhinovirus-Infected Epithelial Cells Produce More IL-8 and RANTES Compared With Other Respiratory Viruses*. Allergy Asthma Immunol Res, 2013. **5**(4): p. 216-23.

277. Lopez-Souza, N., et al., *In vitro* susceptibility to rhinovirus infection is greater for bronchial than for nasal airway epithelial cells in human subjects. J Allergy Clin Immunol, 2009. **123**(6): p. 1384-90 e2.
278. Rahman, M.S., et al., *IL-17R* activation of human airway smooth muscle cells induces *CXCL-8* production via a transcriptional-dependent mechanism. Clin Immunol, 2005. **115**(3): p. 268-76.
279. Kaufmann, R. and M.D. Hollenberg, *Proteinase-activated receptors (PARs) and calcium signaling in cancer*. Adv Exp Med Biol, 2012. **740**: p. 979-1000.